UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

Année 1964 N° 26

LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES de DIFFÉRENCIATION des HÉMOGLOBINES HUMAINES

Leur Application aux Enquêtes Hémotypologiques

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1964

par

Jacques POËY

Assistant de Toxicologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Membres du Jury

Profrs P. BOURBON	*Président*
J. RUFFIÉ DOUSTE-BLAZY G. PITET	*Assesseurs*
G. BROUSSY	*Suppléant*

LES IMPRESSIONS OFFTYP
11, rue Saint-Papoul
TOULOUSE
1964

LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES de DIFFÉRENCIATION des HÉMOGLOBINES HUMAINES

Leur Application aux Enquêtes Hémotypologiques

Travail de laboratoire de Biochimie
du Centre Régional de Transfusion Sanguine
et de la chaire de Chimie Analytique, Toxicologie
et Hygiène Industrielle de la
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

Année 1964 — N° 26

LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES de DIFFÉRENCIATION des HÉMOGLOBINES HUMAINES

Leur Application aux Enquêtes Hémotypologiques

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1964

par

Jacques POËY

Assistant de Toxicologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Membres du Jury

Profrs P. BOURBON	*Président*
J. RUFFIÉ, DOUSTE-BLAZY, G. PITET	*Assesseurs*
G. BROUSSY	*Suppléant*

LES IMPRESSIONS OFFTYP
11, rue Saint-Papoul
TOULOUSE
1964

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN ..... M. LAZORTHES
1er ASSESSEUR ..... M. BLANC
2e ASSESSEUR ..... M. SOREL

DOYENS HONORAIRES

MM. GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. RIBAUT, VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BOUNHOURE, BUGNARD.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. MERIEL
Clinique médicale	GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique	FABRE (P.)
Clinique chirurgicale et du cancer	GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques ..	BAZEX
Clinique des maladies de la tuberculose et pat. int.	MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires	LHEZ
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL
Clinique médicale de la première enfance	BARDIER
Clinique de neuro-chirurgie	LAZORTHES
Clinique neurologique et psychiatrique	GERAUD
Clinique obstétricale	GUILHEM (P.)
Clinique odonto-stomatologique	CADENAT
Clinique ophtalmologique ..	CALMETTES
Clinique O.R.L. et chirurgie maxillo-faciale	CALVET
Clinique rhumatologique ...	RUFFIE (R.)
Clinique traumatologique des membres	RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale	PONTONNIER
Anatomie	N...
Anatomie appliquée	POULHES
Anatomie pathologique ...	FABRE (J.)
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale	ANDRIEU
Chimie biologique	VALDIGUIE
Electro-radiologie	MARQUES
Embryologie générale	BROUSSY (J.)
Histologie	BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DARNAUD
Médecine légale et médecine du travail	PLANQUES
Médecine sociale	N...
Parasitologie	BOUISSET
Pathologie chirurgicale	DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale ...	SENDRAIL
Physico-chimie	AUVERGNAT
Physiologie	LAPORTE (Y.)
Physiologie appliquée et pharmacologie	BAISSET
Physique biologique et médicale	N...
Propédeutique médicale ..	LAPORTE (J.)
Thérapeutique	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	M. COULOUMA
Bactériologie	Mme ENJALBERT
Biochimie médicale	MM. DOUSTE-BLAZY
Médecine générale	MONNIER
Oto-Rhino-Laryngologie ...	CLAUX
Pathologie médicale	BOULARD
Pathologie chirurgicale ...	LAGROT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Histologie et Embryologie.	MM. PLANEL
Ophtalmologie	DEODATI
Parasitologie	RUFFIE (J.)
Physiologie	MONTASTRUC
Physique médicale	BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	MM. BASTIDE
Anatomie Pathologique ...	BOUISSOU
Anesthésiologie	LARENG
Carcinologie	ESTRADE
Chirurgie générale	ENJALBERT
»	GEDEON
»	SARRAZIN
»	SOUQUET
Electro-radiologie	PONS
Hématologie	DUCOS
Histologie et embryologie ..	GUILHEM (A.)
Maladies infectieuses	ARMENGAUD
Pathologie expérimentale ..	GLEIZES
Physiologie	BESSOU
Physique médicale	COMMANAY
Pneumo-phtisiologie	MIGUERES

AGREGES

Médecine générale	MM. RIBAUD
»	CALAZEL
»	RASCOL
»	LE TALLEC
»	RIBET
Chirurgie générale	FICAT
»	PASQUIE
»	GAUBERT
Dermatologie et syphiligraphie	DUPRE
Hydrologie	DENARD
Médecine légale	GREZES-RUEFF
Neurochirurgie	ESPAGNO (J.)
Neurologie et psychiatrie ..	GAYRAL
Obstétrique	ESPAGNO (G.)
Ophtalmologie	BEC
Pneumo-phtisiologie	DELAUDE

AGREGES LIBRES

Anatomie	MM. THOMAS
Pathologie chirurgicale ...	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie .	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle	MM. BOURBON
Chimie pharmaceutique ...	BLANC
Matière médicale	VINCENT
Pharmacie chimique et pharmacodynamie	CAUJOLLE
Pharmacie galénique	STANISLAS
Zoologie	ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Botanique	MM. ROQUES
Pharmacie	COUTURIER
Sciences Naturelles	Mme CAUJOLLE

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Microbiologie	MM. BREUILLAUD
Sciences Physiques	PITET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Toxicologie	M. BROUSSY (G.)

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal	MM. ROCHE
Secrétaire	BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891

A MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546523_0037

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. BOURBON

Professeur de Chimie Analytique, Toxicologie et Hygiène Industrielle

Vous nous avez accueilli dans votre laboratoire et n'avez cessé de nous témoigner votre confiance.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer ici l'assurance de notre indéfectible et respectueux dévouement.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur J. RUFFIE

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté
Directeur du Centre Régional de Transfusion
Sanguine de Toulouse

Il n'a jamais cessé de nous manifester un bienveillant intérêt en nous permettant de poursuivre ce travail dans ses laboratoires.

Qu'il trouve ici la bien modeste expression de notre gratitude.

Monsieur le Professeur DOUSTE-BLAZY

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté

Qui a si aimablement accepté de juger notre travail. En témoignage de respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur G. PITET

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté
Inspecteur Principal des Pharmacies

Qu'il trouve ici
l'expression de notre
vive et respectueuse
gratitude pour l'inté-
rêt qu'il n'a cessé de
nous témoigner.

Monsieur le Professeur G. BROUSSY

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté

Qu'il trouve ici
l'expression de nos
remerciements et de
notre profond respect.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE
MEDECINE ET DE PHARMACIE

Hommages respectueux.

Il nous est particulièrement agréable de remercier ici :

Monsieur le Docteur R. CABANNES

Chef du Service de Biochimie appliquée à l'Hématologie au Centre de Transfusion Sanguine.

Qui a bien voulu nous faire profiter de sa très grande expérience et qui fut pour nous un guide précieux au cours de l'élaboration de ce travail. Qu'il trouve ici la bien modeste expression de notre gratitude.

Monsieur R. VIGNES

Chef de Travaux Pratiques à la Faculté

Dont les conseils nous ont toujours été précieux Avec notre déférente gratitude.

Tous mes Camarades du Laboratoire de Toxicologie

Dont l'aide ne nous fit jamais défaut. Nous les assurons de notre amitié et de notre affection.

PLAN GENERAL

INTRODUCTION.

CHAPITRE I : Les Différentes Hémoglobines Humaines et leurs critères de différenciation.

CHAPITRE II : Revue Générale des Techniques.

A - Obtention d'une solution Hémoglobinique pure et titrée.

B - Méthodes Biochimiques.

C - Méthodes Physico-Chimiques.

D - Méthodes à la fois Biochimiques et physico-chimiques.

E - Autres Techniques.

CHAPITRE III : Choix d'une Méthode pour l'investigation Hémotypologique.

CHAPITRE IV : Application des Techniques Sélectionnées à l'Enquête Anthropologique.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

INTRODUCTION

De toutes les protéines animales, c'est certainement l'Hémoglobine qui a été la plus étudiée. Pendant longtemps elle n'a été considérée que comme un pigment transporteur d'oxygène et à ce titre, n'intéressait que les Physiologistes.

Certes, la fixation réversible de l'oxygène par l'Hémoglobine, n'est pas un phénomène unique. D'autres pigments respiratoires, comme l'hémocyanine, sont à même de fixer l'oxygène pour le libérer de nouveau lorsque la pression partielle se retrouve à un niveau suffisamment bas. Toutefois, l'Hémoglobine a ceci de particulier, c'est qu'elle satisfait à son rôle à des pressions d'oxygène très variables.

Mais le rôle de l'Hémoglobine ne se limite pas à la fixation de l'oxygène et du gaz carbonique. On a pu mettre en évidence par exemple l'action tampon que joue l'Hémoglobine dans la protection de l'acidose.

Les Physiologistes ne sont pas les seuls à s'être intéressés à l'Hémoglobine. On peut même dire qu'il n'existe guère de combinaisons dont les propriétés physiques et chimiques soient mieux connues. Ceci est peut-être dû au fait qu'il est relativement facile d'obtenir l'Hémoglobine à l'état pur.

L'étude des propriétés physico-chimiques

de l'Hémoglobine fit apparaître des variations, selon les échantillons. Ainsi KORBER, dès 1866, remarque la résistance à la dénaturation alcaline (R.D.A) du sang du cordon. Il faut ensuite attendre 1949 date où PAULING et COLL.(51) prouvent de façon indiscutable par électrophorèse libre, l'hétérogénéité de l'Hémoglobine, dans la drépanocytose Depuis, de très nombreux travaux, ont permis de mettre en évidence, non seulement plusieurs variétés d'Hémoglobines anormales, mais aussi de montrer que l'Hémoglobine normale est constituée de plusieurs fractions.

Ces différences, ont tout naturellement amené les Biochimistes, à se pencher sur la structure de la molécule d'Hémoglobine. Les travaux entrepris, nous permettent, à l'heure actuelle d'avoir une idée assez nette de la partie protéique de cette molécule, le groupement prosthétique étant connu depuis déjà un certain temps. L'hétérogénéité des pigments hémoglobiniques humains a été ainsi confirmée et expliquée par la découverte de variations minimes dans la structure de la Globine

Mais l'étude des Hémoglobines, du point de vue biochimique, n'a pas seulement permis une meilleure connaissance de la structure chimique des Hémoglobines. Elle intéresse aussi les Généticiens. Ainsi NEEL (50) voit sa théorie génétique de la drépanocytose appuyée par les recherches de PAULING. Par cette théorie, ces auteurs considéraient la drépanocytose, comme un caractère héréditaire qui à l'état hétérozygote ne détermine aucun trouble, mais provoque une anémie hémolytique grave chez l'homozygote. Or, dans le premier cas, l'électrophorèse décèle deux hémoglobines,

l'une normale, l'autre anormale ; et dans le second cas, seulement, l'anormale. Depuis cette première relation, de très nombreux travaux sont venus confirmer et compléter le caractère héréditaire des Hémoglobines anormales. L'étude de la structure intime des Globines a permis de se faire une idée, non plus seulement qualitative, mais quantitative, des mutations génétiques.

Par là même, la relation entre les gènes, supports de l'hérédité, et les protéines, s'en est trouvée précisée. L'aphorisme "un gène - un enzyme" stipule qu'un gène peut assurer la synthèse d'un seul enzyme dont la fonction essentielle est de provoquer une réaction biochimique déterminée. Cette loi, dans le cas des Hémoglobines, devient un "gène - un polypeptide" grâce aux très importants travaux d'INGRAM (35-36) qui a étudié la structure intime des chaînes polypeptidiques constituant la Globine.

Comme nous venons de le voir rapidement, la connaissance biochimique des Hémoglobines, intéresse non seulement les Biochimistes, mais aussi les praticiens et les Généticiens. De plus, les caractères génétiques ont souvent une fréquence variable, dans les divers groupes humains, si bien que, les anthropologistes, se sont mis, à leur tour, à examiner la distribution des variantes de l'Hémoglobine.

Toute l'importance du dépistage des anomalies biochimiques des Hémoglobines humaines, apparaît ainsi clairement.

Nous allons nous efforcer, dans cette

thèse, d'étudier les différentes méthodes qui permettent l'approche de ces notions. Nous donnerons ensuite des exemples d'application.

CHAPITRE I

Les Différentes Hémoglobines Humaines & Leurs Critères de Différenciation.

I - Rappel des Notions Classiques.-

1° - Définition de l'Hémoglobine.-
2° - Structure Chimique des Hémoglobines.-
3° - Les Hémoglobines Normales.-
4° - Les Hémoglobines Anormales.-

II - Classification des Hémoglobines Humaines.-

III - Critères de Différenciation.-

1° - Les Mutations Visibles.-
2° - Les Mutations Invisibles.-

I - RAPPEL DES NOTIONS CLASSIQUES.-

1° - Définition de l'Hémoglobine.-

L'Hémoglobine peut être définie de deux manières différentes selon que l'on se place du point de vue physiologique ou du point de vue biochimique.

Pour le Physiologiste, l'Hémoglobine est le pigment responsable de la fonction respiratoire sanguine ; c'est-à-dire un corps possédant la propriété de s'unir aux gaz et en particulier à l'oxygène et au gaz carbonique, et assurant ainsi les échanges gazeux au niveau des cellules.

Pour le Biochimiste, l'Hémoglobine est le chromoprotéide porphyrinique, renfermant du fer, qui se rencontre non seulement chez les vertébrés, mais aussi chez les invertébrés et même chez les Protozoaires. Chez les vertébrés, l'Hémoglobine est véhiculée par les hématies, chez les invertébrés elle est, soit dissoute dans le plasma (Annélides), soit dans le liquide coelomique (sangsues) ou encore enfermée dans les hématies (Németiens).

Les hématies humaines renferment environ 32 % d'Hémoglobine soit 15 grammes pour 100 millilitres de sang total, valeur sensiblement deux fois plus élevée que la quantité de protéines plasmatiques.

2° - Structure Chimique de l'Hémoglobine Humaine.-

L'analyse élémentaire montre que l'Hémo

globine renferme 0,34 g.% de fer. Le poids moléculaire minimum, calculé sur la base d'un atome-gramme de fer, par molécule, avoisine 17.000. En réalité l'Hémoglobine humaine est une association du monomère de poids moléculaire 17.000. Cette molécule doit être considérée comme résultant de l'association de quatre sous-unité, car la masse moléculaire, mesurée par les techniques d'osmométrie, d'ultracentrifugation et de vitesse de diffusion, atteint 68.000

L'Hémoglobine, comme tous les héteroprotéides, se dédoubie en deux constituants principaux :

- le groupement prosthétique ou hème,
- la protéine ou globine.

L'hème est un pigment coloré, composé d'un noyau tétrapyrrolique, ayant en son centre un atome de fer. Il se combine d'une manière réversible avec l'oxygène et constitue la partie physiologiquement active de la molécule.

La Globine : Il existe autant de globines que d'Hémoglobines. Mais ces protéines ont des propriétés communes, dont les plus importantes sont le caractère neutre (point isoélectrique voisin de 7,0) et une teneur élevée en histidine (8 à 10 %).

La structure intime de la molécule d'Hémoglobine a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. On admet, par comparaison avec la structure des complexes métalliques colorés de la phtalocyanine, que l'atome de fer de l'hème, est situé au centre d'un carré, dont les quatre angles sont formés par les quatre atomes d'azote des deux cycles pyrroliques. L'atome de fer apparaît comme hexacoordiné ; les deux liaisons non occupées par

les atomes d'azote sont utilisées l'une pour s'unir à la globine, l'autre pour fixer l'oxygène.

La liaison du fer avec la globine, s'effectuerait par l'intermédiaire du noyau imidazole de l'histidine (fig. 1). Des considérations de magnétochimie, indiquent que cette liaison est ionique dans l'Hémoglobine, mais qu'elle devient covalentielle dans l'oxy-Hémoglobine.

L'étude des diagrammes de rayons X par BRAGG - KENDREW - et PERUTZ, montre que la molécule d'Hémoglobine se présente comme un ellipsoïde (55 x 55 x 70 Å) formé de l'association de deux moitiés identiques, renfermant chacune deux hèmes.

Chaque demi-molécule est constitué de deux chaînes polypeptidiques différentes (RHINESMITH - SCHROEDER et PAULING - 1957).

Enfin, chaque molécule contient approximativement 560 acides aminés, parmi lesquels 18 variétés différentes ont été identifiées.

Les travaux de PERUTZ (1951 - 62), de KENDREW (1960) et de CULLIS (1961 - 62) ont abouti à la représentation spatiale de la molécule d'Hémoglobine, chaque chaîne se présentant sous la forme d'un hélicoïde de révolution. Ces quatre chaînes polypeptidiques sont disposées symétriquement par rapport à un axe (fig. 2).-

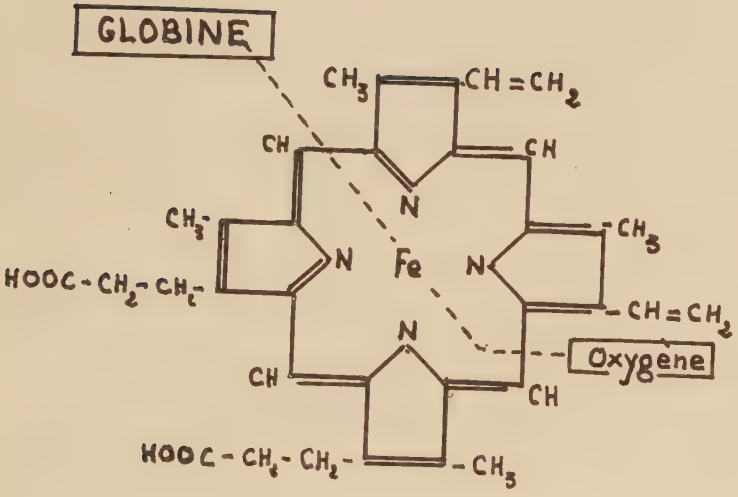

GLOBINE
CH3
CH=CH2
CH
CH
N
CH3
CH3
N
Fe
N
HOOC-CH2-CH2-
CH=CH2
N
Oxygène
CH
CH
HOOC-CH2-CH2-
CH3

Fig. 1

3° - Les Hémoglobines Normales.-

Dès 1886, KORBER avait remarqué que le pigment rouge du sang de l'adulte (Hb A) était beaucoup plus facilement dénaturé par les bases, que celui du sang ombilical (Hb F). Toutes les recherches entreprises depuis, avaient montré que ce phénomène était indépendant de la teneur en fer et sans rapport avec les groupements hème. Il s'agit plutôt de différences fondamentales entre les constituants protéiques des deux pigments.

Au cours des dix dernières années, on a constaté que même l'Hémoglobine normale de l'adulte, n'était pas uniforme. KUNKEL & COLL (45) ont découvert qu'elle se composait d'une fraction principale ou Hémoglobine A, dans une proportion de 97 %, à laquelle vient s'ajouter une fraction accessoire, mais constante, constituée d'Hémoglobine A_2 qui s'y trouve dans une proportion de 2 % environ, et d'une fraction F à raison de 0,1 % à 1 %.

Une analyse plus détaillée de chacune de ces Hémoglobines a permis de mettre en évidence leur héterogénéité, mais aussi de connaître la structure intime de leurs globines, étant entendu que le groupement posthétique a une formule constante, pour toutes les Hémoglobines.

ROCHE & DERRIEN (55) ont réussi à montrer que l'Hémoglobine A, était constituée de trois fractions O, a_1 et a_2. Ceci, sans parler des fractions X, non colorées, appelées protéines d'accompagnement et récemment identifiées à l'anhydrase carbonique. L'Hb F possédant f_1, f_2 et f_3.

En réalité, l'Hb A, contient des traces de f_1, f_2 et f_3 et l'Hb F, un pourcentage variable de a_1 et a_2. Ces diverses fractions ont été aussi obtenues par d'autres auteurs (MORRISON et COOK -49- PRINZ et HUISMAN -53-)

Une étude chimique plus poussée des chaines polypeptidiques de la globine a permis de découvrir, dans les Hb F, A et A2 quatre chaines différentes, que l'on a désignées par les lettres $\alpha, \beta, \gamma, \delta$.

Les chaines α, β, γ ont été identifiées tout d'abord par leurs groupements terminaux, notamment par SCHROEDER et Coll. INGRAM & JONXIS ont ensuite réussi à distinguer la chaine δ de la chaine β à laquelle elle ressemble beaucoup, par des méthodes chromatographiques.

Les chaines d'acides aminés des trois hémoglobines normales, sont les suivantes :

pour l'Hémoglobine A : $\alpha_2 \beta_2$ ou α-β-$\alpha\beta$
pour l'Hémoglobine F : $\alpha_2 \gamma_2$ ou $\alpha\gamma$ -$\alpha\gamma$
pour l'Hémoglobine A_2: $\alpha_2 \delta_2$ ou $\alpha\delta$-$\alpha\delta$

La chaine α est constituée de 141 acides aminés et les chaines β, γ, δ de 146.

Récemment a été mise en évidence (HUCHRIS & Coll - 1963) une cinquième chaine, la chaine ε de l'Hémoglobine GOWER, fraction anormale de l'Hémoglobine foetale.

Les trois Hémoglobines F, A et A_2 possèdent en commun les chaines α et se distinguent

dans la seconde moitié de leur molécule.

Ces différences, qui sont en fin de compte, des variations dans le nombre d'acides aminés, nous permettront plus loin, d'expliquer les différences de propriétés physico-chimiques, mises à profit, pour séparer ces hémoglobines.

3° - Les Hémoglobines Anormales.-

L'existence d'Hémoglobines, autres que les pigments précédemment décrits, fut démontrée, pour la première fois, par PAULING SINGER - ITANO et WELLS, en 1949 (51). Ces auteurs, étudiant sur le plan biochimique la drépanocytose, découvrirent que cette affection se caractérisait, par la présence d'un pigment anormal, l'Hémoglobine S. Depuis cette date, plus de 40 variétés anormales d'Hémoglobines, ont été reconnues. Elles ont été identifiées, soit au cours de recherches portant sur des malades atteints d'anémies hémolytiques, soit au cours d'enquêtes génétiques ou anthropologiques.

Un certain nombre de ces pigments anormaux se trouvent en effet, liés à des maladies dont le signe principal est une anémie plus ou moins importante. Par contre, d'autres hémoglobines anormales, ne semblent liées à aucune affection apparente.

Après avoir décrit en quoi ces pigments diffèrent des hémoglobines normales, d'un point de vue strictement biochimique, nous verrons leur importance génétique, en antrophologie et aussi du point de vue clinique.

a - Aspects biochimiques des Hémoglobines anormales .-

Comme pour les Hémoglobines normales, les différents travaux de dépistage et d'identification des pigments anormaux, ont montré que ceux-ci diffèrent entre-eux, essentiellement par leur globine.

L'étude détaillée des chaines polypeptidiques, constituant cette protéine, a permis de mettre en évidence, des variations, dans certains peptides, plus précisément la substitution d'un acide aminé dans certaines séquences d'amino-acides. Il en résulte que le peptide considéré est anormal. Parfois c'est une chaine polypeptidique qui est, tout entière, remplacée par une autre.

Si certaines hémoglobines anormales, n'ont pas encore bénéficié d'études suffisamment complètes, pour que leur défaut de structure intime soit révélé, c'est à dire que l'on ignore l'enchainement des différents acides aminés, on sait cependant, avec précision, sur quel peptide ou sur quelle chaine, réside la variation, dans toutes les hémoglobines détectées à ce jour.

Il est acquis, par exemple, que les Hémoglobines D alpha, I, P, K, Q, sont conditionnées par une mutation, qui siège sur la chaine α .

Pour les Hémoglobines S, C, D béta, E, G et N, la mutation siège sur la chaine béta (β).

On sait aussi que l'Hémoglobine H, est entièrement constituée de chaines béta, c'est un tétramère d'Hb β (β_4^H). HUNT et LEHMANN (33) ont aussi montré que l'Hémoglobine "BART'S" est composée de quatre chaine gamma γ (γ_4). Elle est considérée comme l'équivalent fœtal de l'Hb-H.

Pour certaines variétés d'Hémoglobines, nos connaissances biochimiques sont plus complètes. Ainsi INGRAM (34) a montré que les Hb S et C, étudiées par rapport à l'Hb A, se différencient de cette dernière au niveau du peptide n° 4. L'étude de la séquence d'amino-acides constitutifs de ce peptide n° 4 nous montre qu'un acide glutamique de l'Hb A, est remplacé par une Valine dans l'Hb S et par une Lysine dans l'Hb C. Nous avons les formules suivantes :

Hb A : His-Val-Leu-Leu-Thr-Prol-Glu-Glu-Lys
Hb S : His-Val-Leu-Leu-Thr-Prol-Val-Glu-Lys
Hb C : His-Val-Leu-Leu-Thr-Prol-Lys-Glu-Lys

Il existe enfin un certain nombre de variantes d'Hémoglobines anormales. Ainsi les Hémoglobines I_2 - M_2 - G_2 - NORFOLK 2 qui sont aux Hémoglobines I, M, G et NORFOLK, ce que l'Hb A2 est à l'Hb A. Ces variantes résultent en effet, de la combinaison de chaines α anormales, avec des chaines δ normales.

Pour en terminer avec les différentes Hémoglobines anormales, citons l'Hémoglobine LEPORE qui est un mélange des Hb A, A_2 et F. Elle renferme les quatre chaines polypeptidiques : α , β , γ et δ

La connaissance des anomalies biochimiques du pigment hémoglobinique, outre son intérêt dans l'étude des protéines, a une importance très grande sur le plan génétique et aussi en anthropologie et en clinique.

b - Intérêt Génétique des Hémoglobines Anormales.

Nous avons déjà vu que la découverte de l'Hb S par PAULING et Coll, était venue confirmer de manière éclatante, la théorie génétique de NEEL, sur la drépanocytose. L'étude des modifications structurales de la Globine a permis à PAULING d'utiliser le terme de "Maladie Moléculaire" dans les anémies à drépanocytes.

Par la suite, on a démontré, que la majorité des Hémoglobines Anormales étaient héréditaires et respectaient les lois de MENDEL. Grâce aux travaux d'INGRAM en particulier, la connaissance de la structure intime des Hémoglobines, a permis de résoudre des problèmes génétiques jusque là demeurés sans réponse.

Ainsi la mise en évidence par quelque auteurs de 3 ou 4 fractions hémoglobiniques distinctes, dans le sang de certains sujets :

A D K (CABANNES et PORTIER)
A G C X (ATWATTER-SCWARTZ et TOCANTINS)

n'a pu être expliquée que par la présence de deux systèmes alléliques conditionnant la synthèse de

l'Hb A.

Les connaissances biochimiques d'une part et les études de transmission héréditaire, des fractions anormales d'autre part ont permis de penser, qu'il y a en fait 4 gènes pour l'Hémoglobine. Chacun de ces gènes, porté ou non par le même chromosome, serait responsable de la synthèse d'une de ces quatre chaines polypeptidiques. Les altérations constatées sur les chaines, illustrent les effets chimiques des mutations subies par le gène mendélien responsable.

c - Intérêt Anthropologique des Hémoglobines Anormales.

Des études portant sur un ensemble de population a permis de constater la distribution géographique de certaines hémoglobines anormales.

Ainsi l'Hémoglobine S est très répandue. L'Hémoglobine C est surtout rencontrée dans la partie Ouest de l'Afrique, au Sud du Sahara, l'Hémoglobine E, dans la partie de l'Asie du Sud-Est entre la Chine et les Indes. L'Hémoglobine D trouvée au début chez les Anglo-Saxons, a ensuite été découverte par LEHMANN aux Indes, par CABANNES en Algérie. Les autres Hémoglobines ont des localisations moins nettes ; ainsi H a été trouvé chez les Chinois et des Philippins, G, I et J chez des Noirs.

L'étude de la répartition des Hémoglobines Anormales peut apporter à la connaissance des mouvements et des origines de certaines populations, des notions capitales.

d - Intérêt clinique des Hémoglobines Anormales.

Comme nous l'avons déjà signalé, un certain nombre d'Hémoglobines anormales sont liées à des affections héréditaires, les hémoglobinopathies. Nous devons cependant distinguer deux catégories :

- Les Hémoglobinopathies dues à la présence d'Hb anormales.
- Les Hémoglobinopathies caractérisées par des variations des constituants normaux de l'Hb.
- Les Hémoglobinopathies dues à la présence d'Hémoglobines Anormales.

Elles sont caractérisées par la présence dans le sang du malade de pigments anormaux tels S, C, D, etc... Ces fractions anormales remplacent la totalité de l'Hb A. On est alors en présence d'un homozygote. Elles sont associées à l'Hb A. On est en présence d'un hétérozygote. Ces affections se caractérisent généralement par une anémie hémolytique, de pronostic variable chez les homozygotes. La maladie est inapparente chez les héterozygotes.

Parmi ces hémoglobinoses, la drépanocytose est dûe à la présence de l'Hb S seule ou associée à Hb A ; elle est toujours marquée par la falciformation des hématies en milieu privé d'oxygène.

L'hémoglobinose C est relativement bénigne, qu'elle soit homozygote ou hétérozygote. L'hémoglobinose D est rare. On a décrit également

des associations SC, CD, SG, et aussi parfois la présence d'hémoglobine F.

Les autres Hémoglobines n'ont jamais été détectées au cours des maladies dont elles auraient été la cause.

- Les Hémoglobinopathies caractérisées par des variations de constituants normaux de l'Hb.

Les Thalassémies sont essentiellement caractérisées par un taux anormalement élevé d'Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$) hémoglobines alcalino-résistantes, ou d'Hb A_2 ($\alpha_2 \delta_2$). Il s'agirait donc, non d'une anomalie structurale d'une chaine, mais de la production exagérée d'une chaine normale. Cette hyperproduction des chaines γ et δ est la conséquence d'une insuffisance de production de la chaine α dans la Thalassémie α, ou de la chaine β dans la Thalassémie β.

Parmi les syndromes thalassémiques, l'Anémie de COOLEY forme homozygote, très grave, est incompatible avec la vie. La microcytémie de SIVESTRONI et BIANCO et la thalassémie mineure de RIETTE - GREPPI et MICHELI sont mieux tolérées, car portées par les hétérozygotes du trait qui en assure la transmission.

Parfois les thalassémies peuvent être associées à des hémoglobinoses S, C, E et H leur donnant alors un caractère grave.

II - Classification Biochimique des Hémoglobines Humaines.

Cette classification est basée essentiellement sur les caractères biochimiques que nous venons de voir, comparés aux fractions normales F, A et A_2.

Rappelons cependant la constitution de ces trois fractions normales :

Hb A : $\alpha_2 \beta_2$ ou $\alpha\beta - \alpha\beta$
Hb F : $\alpha_2 \gamma_2$ ou $\alpha\gamma - \alpha\gamma$
Hb A_2: $\alpha_2 \delta_2$ ou $\alpha\delta - \alpha\delta$

1°- Hémoglobines à Anomalies qualitatives structurales.

Remplacement ou anomalies de position d'un acide aminé :

- Mutation siégeant sur la chaine α :
  Hb D alpha, I, P, K, Q.
- Mutation siégeant sur la chaine β :
  Hb S, C, D béta, E, G, N.

2° - Hémoglobines à Anomalies quantitatives structurales.

L'anomalie porte ici, sur la synthèse globale d'une chaine :

- Défaut partiel de la chaine α: Thalassémie α avec hyperproduction δ (A_2)
- Défaut partiel de la chaine β: Thalassémie β avec hyperproduction γ (F)

- Polymérisation des chaines { Hb Bart's (γ_4) / Hb H (β_4)
- Mélange des quatre chaines Hb LEPORE ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) avec une disposition chimique non encore élucidée.

3° - Hémoglobines réunissant des anomalies particulières et rares.

Ces Hémoglobines sont constituées par la combinaison de chaines α anormales, avec des chaines δ normales. Elles sont donc des formes anormales de l'Hb A2. On connait actuellement les fractions I_2, M_2, G_2 et NORFOLK 2.

III - CRITERES BIOCHIMIQUES DE DIFFERENCIATION DES HEMOGLOBINES .-

Historiquement, la première différenciation des pigments hémoglobiniques, est constituée par la découverte de KORBER en 1886. Depuis, le premier examen biochimique effectué lors de l'étude des hémoglobinoses, a été le test de Résistance à la Dénaturation Alcaline (R D A) Il a permis à VECCHIO et Coll. de définir l'anomalie hémoglobinémique de la maladie de COOLEY.

Les résultats obtenus permettent seulement de savoir si le sang examiné contient de l'Hémoglobine alalino-résistante.

Mais l'Hb R.D.A. ne se distingue pas de l'Hb A seulement par une plus grande stabilité de sa liaison hème-globine, en milieu alcalin ou acide. Du point de vue physiologique, on s'est aperçu qu'il y avait une différence d'affinité pour l'oxygène. De même le spectre d'absorption dans l'Ultra-Violet montre un déplacement de la bande du Tryptophane de 2.910 Å pour l'Hb A à 2.898 Å pour l'Hb R.D.A

De plus, l'analyse différentielle constate la présence d'isoleucine dans la molécule d'Hb F, alors qu'il n'y en a pas dans l'Hb A.

Les altérations de structure des différentes Hémoglobines entraînent des remaniements électroniques de la molécule et plus particulièrement des différences de charge électrique dues à

la composition de la globine en acides aminés.

Ceci explique le comportement des différents pigments en électrophorèse ou chromatographie. D'un point de vue immunologique de récents procédés permettent de confirmer les variations de la structure protéique de l'Hb.

Il est donc possible d'effectuer l'étude systématique des Hémoglobines en utilisant des techniques mettant en évidence ces variations de comportement de la molécule entière, c'est ce que l'on appelle la recherche des "Mutations Visibles".

Toutefois l'on ne se contente plus de constater "l'effet". Si l'on veut connaître la "cause" de ces variations de comportement aux tests d'analyse, il faut pousser plus avant la recherche. Les techniques utilisées, beaucoup plus fines, mettront alors en évidence les "Mutations Invisibles" au sein même des chaines polypeptidiques de la globine.

1° - Les Mutations Visibles.

Le test de la R.D.A. a un but bien particulier, au début de l'analyse. C'est toujours l'électrophorèse qui reste le moyen de base. Elle permet le dépistage des anomalies. A ce jour, aucune Hémoglobine Anormale, n'a pu être étudiée avant sa découverte, par ce procédé.

Au début, on a utilisé l'électrophorèse en veine liquide selon TISELIUS. Actuellement le dépistage systématique, préfère l'électrophorèse de zone, sur papier d'abord, amidon, gélose, acétate de cellu-

lose, ou gel acrylamique ensuite. On peut également faire varier la solution tampon dans sa concentration ionique et dans son pH, si bien qu'actuellement il existe toute une série de techniques de dépistage utilisant l'électrophorèse.

Cependant, les renseignements fournis par ce procédé, ne suffisent pas toujours pour identifier une fraction hémoglobinique. C'est pourquoi on a cherché à le doubler par d'autres tests, permettant le diagnostic des variétés d'hémoglobines ayant un comportement électrophorétique identique.

Les premiers HUISMANN et PRINZ (1955) utilisèrent la chromatographie sur résines échangeuses d'ions. Ils employèrent d'abord l'amberlite activée, puis ensuite la DEAE cellulose. Cette dernière permet déjà une évaluation quantitative des diverses fractions hémoglobiniques. On a également utilisé la chromatographie sur papier.

Mais la R.D.A., l'électrophorèse et la chromatographie ne sont pas les seules techniques, permettant de dépister et d'identifier les Hb anormales ou les différentes fractions normales. ROCHE et DERRIEN ont étudié la solubilité des pigments hémoglobiniques dans les solutions de sels neutres, à concentration croissante. L'étude des courbes de relargage obtenues, leur a permis de conclure à l'hétérogénéité des Hb A et F. Cependant ce moyen reste très limité et ne permet pas la différenciation des Hb.

DIACONO, de son côté a poussé très loin l'étude immunologique des mêmes fractions. Par la

réaction de fixation du Complément cet auteur a, non seulement pu différencier l'Hb F de l'Hb A, mais aussi l'Hb C de l'Hb S et l'Hb Thalassémique de l'Hb F.

On a aussi proposé un certain nombre de tests particuliers qui permettent d'aiguiller le diagnostic dans certains cas délicats.

Ainsi la dénaturation par le froid, permet de confirmer si elle est positive, la présence d'Hb H.

De même une étude hématologique, apporte des renseignements utiles : le test de falciformation des hématies la présence d'inclusions et de cristaux intra-érythrocytaires.

L'utilisation de l'ensemble de ces techniques a permis de découvrir et de caractériser à ce jour plus de quarante hémoglobines anormales.

Ce résultat satisfait le clinicien. Il lui fournit la preuve étiologique d'un certain nombre d'anémies hémolytiques, dont la classification nosologique n'avait pu être possible De même l'Anthropologue se contente de ces résultats Ils lui apportent de nouvelles données pour le typage systématique des populations. Mais pour le Généticien et le Biochimiste, une fois les diverses fractions séparées, il convient de rechercher les différences structurales, c'est à dire faire apparaître les "Mutations Invisibles". Pour cela on doit faire appel à des techniques plus perfectionnées plus fines que les précédentes.

2° - Les Mutations Invisibles

Ce furent tout d'abord les travaux de

RHINE SMITH, SCHROEDER et PAULING (1957) qui montrèrent que l'Hémoglobine Humaine, était composée de quatre chaines polypeptidiques, de deux types différents. Ensuite, les travaux de PERUTZ (1951-62) de KENDREW et de CULLIS et Coll. (1961-62) aboutirent à la représentation spatiale.

Ces travaux ont essentiellement consisté en:
- d'une part, séparation des différentes chaines,
- d'autre part, identification des séquences d'acides aminés au sein des peptides isolés des chaines polypeptidiques.

Mais il fallut attendre les études de INGRAM, de HUNT, de BAGLIONI (1955-1963) pour pouvoir détecter les anomalies moléculaires de l'Hémoglobine.

Ces "Mutations Invisibles" sont mises en évidence, par différentes techniques révélant :
- d'abord les chaines anormales,
- ensuite le peptide défectueux,
- et enfin, l'anomalie structurale, au sein d'une séquence d'amino-acides.

a - Procédés de Séparation des Chaines et détection de l'Anomalie Caténaire.

L'étude des quatre chaines polypeptidiques et par la suite la recherche de la structure des différentes Hémoglobines, fut entreprise par plusieurs chercheurs.

ITANO et SINGER, par dissociation à PH 4,3 ont montré que l'Hémoglobine humaine,

peut être divisée en deux demi-molécules d'égale valeur. Cette dissociation s'effectue soit de façon symétrique ($\alpha\beta - \alpha\beta$), soit de manière dissymétrique (α_2 et β_2).

GUTGROUND, par osmose de l'Hémoglobine dans des solutions salines concentrées, et REICHMANN et COLVIN, par électrophorèse à pH très bas, ont démontré la présence de quatre unités polypeptidiques.

Le traitement préalable de l'Hémoglobine, par un tensio-actif, le dodécyl sulfate de sodium, suivi de l'électrophorèse, montre que ces quatre chaines se groupaient en deux : un type rapide et un type lent. Ces chaines sont ensuite caractérisées par leurs résidus terminaux.

- La chaine alpha (α) du type lent à l'électrophorèse, possède val- leu- ser- comme aminoacides initiaux.
- La chaine (β) du type rapide, commence par val - his - leu.
- La chaine gamma (γ) les groupes glycine et histidine.
- La chaine delta (δ) ressemble beaucoup à β mais a pu en être différenciée par chromatographie.

A la suite d'ITANO, VINOGRAD, HUTCHINSON et SCHROEDER en 1959 sont arrivés à démontrer que dans les Hb A et S dissociées, puis recombinées, les chaines α sont seules interchangeables, au contraire des chaines β. Ainsi ces auteurs démontrèrent-ils le caractère anormal de la chaine β des Hb S.

GAMMACK (8) et ses Collaborateurs ont ensuite proposé une méthode de dissociation et de recombinaison des chaines d'une Hb inconnue et d'une Hb connue, pour la mise en évidence de la chaine anormale. Ce procédé "d'HYBRIDATION" permet d'obtenir une nouvelle Hb qui est un mélange artificiel des chaines, suivant le tableau ci-dessous :

Hb inconnue dissociée	Hb connue dissociée	Résultats
Chaine α anormale +	Chaine β normale	Hb inconnue anormale
" β " +	" α "	" " "
" α " +	" β anormale	HYBRIDE doublement anormale
" β " +	" α "	" " "
" α normale +	" β "	" " "
" β " +	" α "	Hb anormale connue
" α " +	" β normale	" normale connue

Exemple : Hybridation de l'Hb X ($\alpha_2^X \beta_2$) connue avec l'Hb Y ($\alpha_2 \beta_2^Y$) inconnue. L'Hb X a une chaine α anormale ; pour l'Hb Y c'est la chaine β.

La dissociation-reassociation des chaines peut s'écrire :

$$\alpha^X\alpha^X\beta\beta + \alpha\alpha\beta^Y\beta^Y \longrightarrow \alpha_2^X\beta_2 + \alpha_2^X\beta_2^Y + \alpha_2\beta_2^Y + \alpha_2\beta_2$$

$$HbX + HbY \rightarrow HbX + \underset{XY}{Hyb} + HbY + HbA$$

En résumé, l'action d'un tampon acide ou alcalin permet de dissocier les chaines des fractions hémoglobiniques en présence. Cette dissociation se fera soit de façon symétrique ($\alpha\beta$-$\alpha\beta$ soit dissymétrique (α_2 et β_2). La dialyse en tampon neutre permet la recombinaison de celles-ci entre elles et la nouvelle composition du mélange est comparée, par des méthodes classiques (électrophorèse, chromatographie) au mélange initial. Il va ainsi apparaître, en plus des fractions déjà connues, une fraction inconnue, qui est le résultat de la combinaison de deux chaines des hémoglobines mises en présence.

Voici quelques exemples pratiques d'Hybridation, qui permettront de mieux comprendre cette méthode :

-Hybridation de l'Hb I et l'Hb C.

$$2\alpha_2 I\beta_2 + 2\alpha_2\beta_2^C \longleftrightarrow \alpha_2^I\beta_2 + \alpha_2^I\beta_2^C + \alpha_2\beta_2^C + \alpha_2\beta_2$$

$$HbI + HbC \longrightarrow HbI + \underset{IC}{Hyb.} + HbC + HbA$$

Sachant par exemple, que l'Hb C a une chaine β anormale on en déduira que c'est la chaine α qui, dans l'Hb I, présente un défaut de structure.

-Hybridation de l'Hb D avec l'Hb G.

$$2\alpha_2^G\beta_2 + 2\alpha_2\beta_2^D \longrightarrow \alpha_2^G\beta_2 + \alpha_2^G\beta_2^D + \alpha_2\beta_2^D + \alpha_2\beta_2$$

$$\underset{G.D}{HbG + HbD \longrightarrow HbG + Hyb. + HbD + HbA}$$

Par ce procédé, on a pu classer les hémoglobines en deux catégories : celles dont l'anomalie siège sur la chaine α et celles pour lesquelles cette différence est sur la chaine β . De la même manière on a pu se rendre compte, que certaines hémoglobines avaient une chaine γ ou une chaine δ à la place de la chaine β et on a pu classer l'Hb H (β_4), l'Hb BART'S (γ_4) et l'Hb LEPORE ($\alpha\beta\gamma\delta$).

b - Identification des acides aminés au sein des peptides isolés des chaines polypeptidiques.

Afin d'analyser la structure intime de ces différentes chaines, INGRAM soumet l'hémoglobine purifiée, à une digestion enzymatique par la trypsine, la chymotrypsine ou la papaïne. La trypsine la plus utilisée, coupe les chaines peptidiques au niveau des ponts carbonyles des résidus de lysine et arginine.

La solution renfermant les peptides est alors soumise :

- soit à une chromatographie et électrophorèse unidimensionnelles,
- soit, surtout, à une électrochromatographie, épreuve bidimensionnelle, qui sépare un certain nombre de peptides et leur attribue une place déterminée, dans le chromatogramme, suivant leur charge et leur composition.

L'élution de chacun des peptides, permet ensuite de déterminer leur composition en amino acides.

L'ensemble de ces techniques a établi, tout d'abord, la constitution des quatre chaines polypeptidiques, que l'on retrouve dans les Hb normales.

- Détection du Peptide anormal
"FINGER - PRINTING"

On traite l'Hb anormale à étudier, par la technique de INGRAM, dont nous venons de décrire le principe. Par la comparaison avec un témoin normal, traité dans les mêmes conditions, on peut déterminer les anomalies peptidiques. Puis on recherche à quel niveau dans le peptide, se trouve la substition d'Amino-Acides.

Les recherches biochimiques, sur ces pigments, représentent l'un des stades les plus avancés, de la chimie des protéines. Mais il reste encore de nombreux points obscurs, dans le comportement de ces chromoprotéides. Ainsi, on constate que de petits changements, dans une molécule de protéine, peuvent donner naissance à de très sérieuses maladies. Mais pourquoi, précisémment ces variations, minimes, entrainent-elles ces désordres organiques de gravité d'ailleurs très variables suivant les individus ? Tout au plus, a-t-on pu mettre en lumière, que les hématies porteuses d'Hémoglobines Anormales, avaient une durée de vie plus courte que les autres.

Pour en terminer avec ce chapître, voici une nomenclature des Hémoglobines Anormales, avec l'indication du défaut.

HEMOGLOBINES ACTUELLEMENT CONNUES

Hb	Anomalies siegeant sur La chaine		Formule et nomenclature moderne	Inventeurs
A		–	$\alpha_2^A \beta_2^A$	
F		–	$\alpha_2^A \gamma_2^F$	Von KORBER 1886
A_2		–	$\alpha_2^A \delta_2^{A_2}$	KUNKEL et WALLENIUS 1956
A_4		?	?	LABIE et Coll 1964
			Variantes de l'HbA	
S		β	$\alpha_2^A \beta_2^{6Val}$	PAULING, ITANO, SINGER et WELLS 1949
C		β	$\alpha_2^A \beta_2^{6Lys}$	ITANO et NEEL 1950
D_β Punjab		β	$\alpha_2^A \beta_2^{121Glu}$	ITANO 1951 BAGLIONI 1962
$D\alpha$		α	$\alpha_2^D \beta_2^A$	INGRAM et Coll. 1957

D Cyprus, Silk, Norfolk Algérie Chicago	β	$\alpha_2^A \beta_2^B$	
E	β	$\alpha_2^A \beta_2^{26\,Lys}$	CHERNOFF et Coll 1954
G Honolulu	α	$\alpha_2^{30\,Glu\text{-}N} \beta_2^A$	SWENSON et Coll 1962
G Philadelphie	α	$\alpha_2^{68\,Lys} \beta_2^A$	BAGLIONI et INGRAM 1961
G San Jose	β	$\alpha_2^A \beta_2^{7\,gly}$	HILL and SCHWARTZ 1959
G Accra	β	$\alpha_2^A \beta_2^G$	EDINGTON et LEHMANN 1954
L	β	$\alpha_2^A \beta_2^L$	AGER et LEHMANN 1957
L Ferrare	α	$\alpha_2^L \beta_2^A$	SILVESTRONI et BIACO 1960
O Indoux	α	$\alpha_2^O \beta_2^A$	LIE - INJO-LUANG-ENG 1958
O Arabe	β	$\alpha_2^A \beta_2^{121\,Lys}$	BAGLIONI et LEHMANN 1962
P	β	$\alpha_2^A \beta_2^P$	SCHNEIDER et HAGGARD 1951
Hb Zurich	β	$\alpha_2^A \beta_2^{63\,Arg}$	MULLER et KINGME 1961
Hb Pylos			FESSAS et Coll 1962
Q	α	$\alpha_2^Q \beta_2^A$	AGER and. LEHMANN 1958
K	α	$\alpha_2^K \beta_2^A$	CABANNES 1955
I	α	$\alpha_2^{16\,Asp} \beta_2^A$	PAGE et RUCKNAGEL 1957

J Trinidad Jamaïque Irlande Malaisie	β	$\alpha_2^A \beta_2^J$	THOROP et ITANO 1956
N	β	$\alpha_2^A \beta_2^N$	ROBINSON et Coll 1956
Hopkins 2	α	$\alpha_2^{No2} \beta_2^A$	SMITH et TORBERT 1958
Norfolk	α	$\alpha_2^{57 Asp} \beta_2^A$	AGER et Coll 1957 BAGLIONI 1962
H	–	β_4^A	RIGAS et Coll 1955
Augusta I	–	β_4^S (?)	HUISMANN 1960
Augusta II	?	?	HUISMANN 1960
M Boston	α	$\alpha_2^{58 Tyr} \beta_2^A$	GERARD et EFRON 1961
M Saskatoon	β	$\alpha_2^A \beta_2^{63 Tyr}$	GERARD et EFRON 1961
M Milwaukee	β	$\alpha_2^A \beta_2^{67 Glu}$	GERARD et EFRON 1961
M Liepzig			BETKE et Coll 1960
M Iwarte			SHISATA et Coll 1960-61
M Kurume			
M Chicago			JOSEPHSON et Coll 1961
M Kankakee			HELLER et Coll 1962
Hb Russ			HUISMANN 1961

Variantes de l'Hb A_2

I_2	α	$\alpha_2^I \delta_2^{A_2}$	BOULARD et Coll 1961
G_2	α	$\alpha_2^G \delta_2^{A_2}$	
L_2	α	$\alpha_2^L \delta_2^{A_2}$	
Q_2	α	$\alpha_2^Q \delta_2^{A_2}$	
β_2 ou A'_2			HUISMANN

Variantes de l'Hb Fœtale

Hb BART'S	–	γ_4^F	AGER et LEHMANN 1958 FESSAS et PAPAS PYROU 1957
Alexandra	–	–	FESSAS et Coll 1959
Roma	γ	$\alpha_2^A \gamma_2^{F\,Roma}$	SILVESTRONI et BIANCO 1963
I Burlington	α	$\alpha_2^{I\,Burlington} \gamma_2^F$	
L Foetale	α	$\alpha_2^L \gamma_2^F$	SILVESTRONI et BIANCO 1963

Hb Embryonnaires

Gower I	-	ε_4^{Gower}	HUENHS et Coll 1963
Gower II	-	$\alpha_2^A \varepsilon_2^{Gower}$	HUENHS et Coll 1963

CHAPITRE II

Revue Générale des Techniques

A - Obtention et titrage d'une Solution Hémoglobinique pure.

B - Techniques Biochimiques.

I - R. D. A.
II - Solubilité dans les Sels neutres.

1° - Technique de ROCHE & DERRIEN
2° - Technique d'ITANO

C - Techniques Physico-Chimiques

I - Electrophorèse.

1° - En veine liquide,
2° - Electrophorèse de zone,
a - sur papier
b - sur Gel d'Amidon,
c - sur bloc d'Amidon,
d - sur Gélose,
e - sur Acétate de Cellulose,
f - sur Gel Acrylamique,

II - Chromatographie.
1° - Chrom. d'adsorption
2° - Chrom. par Echange d'Ions
a - sur Amberlite I R C 50
b - sur Carboxyméthylcellulose,
c - sur DEAE Cellulose,
d - sur Dowex 2

3° - Chromatographie de partage : sur papier.

D - Techniques à la fois Biochimiques & Physico-Chimiques.

I - Mise en Evidence de l'Anomalie caténaire : HYBRIDATION

II - Mise en Evidence du Peptide Anormal.

1° - Digestion Trypsique,
2° - Chromatographie,
3° - Electrophorèse,
4° - Electrochromatographie,

III - Mise en évidence de l'Anomalie, au niveau des Amino-Acides.

E - Autres Techniques.

I - Etude Spectrale,

II - Techniques Immunologiques

1° - R. de fixation du complément.
2° - Immuno électrochromatographie

III - Tests Hématologiques

1° - Recherche des Cellules Cibles
2° - Test de Falciformation
3° - Etude des Cristaux et Corp Intra-Erythrocytaires.

IV - Techniques diverses.

1° - Dénaturation par le froid
2° - Vitesse d'étalement en films monomoléculaires.

A - OBTENTION D'UNE SOLUTION HEMOGLOBINIQUE PURE & TITREE.

La majorité des tests susceptibles de nous renseigner sur la présence, ou non, d'une Hémoglobine anormale, dans le sang humain ne pourra se faire dans de bonnes conditions que si, au préalable, on a isolé, et purifié, le complexe hémoglobinique à étudier.

C'est pourquoi, nous allons tout d'abord indiquer les techniques permettant d'obtenir, à partir du sang total, une solution hémoglobinique, débarrassée des divers éléments plasmatiques ou globulaires, susceptibles de nous géner dans les analyses.

1° - Préparation de la solution Hémoglobinique.

a - Technique Classique.

- Le prélèvement du sang est effectué sur tube sec
- Après coagulation complète, éliminer le sérum, et triturer le caillot.
- Laver les Hématies, trois fois, avec du Sérum Physiologique et centrifuger chaque fois à une vitesse modérée pendant 5 à 10 minutes.
- Ajouter une quantité égale d'eau distillée - Agiter.
- Laisser 24 heures au congélateur.
- Décongeler au bain-marie à 37°

- Ajouter un volume de Toluène - Agiter-
- Laisser 24 heures au réfrigérateur.
- Centrifuger.
- Recueillir la solution Hémoglobinique qui est la couche intermédiaire.

Nous avons apporté une petite modification à cette technique. Après avoir sorti la solution du congélateur, on ajoute une pincée d'Alumine qui facilite la précipitation des stromas, au cours de la centrifugation.

b - Technique de JONXIS & HUISMAN (40)

Ces auteurs reprennent dans l'ensemble, la technique précédente, mais en y apportant deux ou trois petites modifications.

- Ils complètent le lavage au Sérum Physiologique par un lavage avec une solution de Cl Na à 1.25 %.

Après l'Hémolyse, ils agitent le mélange Hémoglobinique avec du silica-gel (célite 535 ou 545) puis filtrent sur Büchner pour éliminer les stromas.

- Ils centrifugent alors à 15 000 t/m pendant 20 minutes, la solution débarrassée du Toluène

- Ils conseillent aussi, pour la conservation, d'ajouter une goutte de solution à 1 % de Merthiolate, ou des antibiotiques.

c - Technique de WATSON-WILLIAM & WEATHERALL (68)

Prélever 20 ml de sang, sur anticoagulant

(ACD, Wintrobe ou Héparine).

- Centrifuger 20 minutes, à vitesse modérée.

- Eliminer le plasma.

- Laver les Globules Rouges ainsi obtenus, par du Sérum Physiologique. Centrifuger. Renouveler cette opération jusqu'à obtention d'un surnageant limpide (en principe 3 fois).

- Ajouter aux globules rouges, ainsi lavés, un volume d'Eau distillée et un demi volume de Toluène. Mélanger, laisser hémolyser au frigidaire une nuit.

- Centrifuger à 3 000 t/m pendant 20 mn

- Filtrer la solution hémoglobinique, débarrassée du Toluène.

- Filtrer la solution obtenue.

d - Technique de LEHMANN

Cet auteur reprend, dans ses grandes lignes, les procédés déjà décrits, mais remplace le Toluène par du Tétrachlorure de Carbone qui permet de se débarrasser des stromas et des ribosomes.

e - Centrifugation à 40 000 G

pendant une heure, sous vide et réfrigération d'une solution contenant de l'eau et des Globules Rouges.

II - Dosage de l'Hémoglobine

La concentration en Hémoglobine, peut être estimée par différentes méthodes. Dans la plupart de celles-ci, l'hémoglobine est transformée en un autre composé, et la couleur de celui-ci est comparée à une gamme étalon. D'autres méthodes dosent le fer contenu dans l'Hémoglobine, et sachant qu'un mole d'Hb contient 0,34 % de fer, il est facile de connaître le taux d'Hémoglobine.

a - Méthode de SALHI à l'Hématine Acide

Cet auteur transforme l'Hémoglobine en Hématine par action de l'acide chlorydrique dilué. La coloration obtenue est comparée à celle d'une solution glycérinée de chlorydrate d'hémine. Cette méthode n'est qu'approximative, l'erreur commise pouvant atteindre 5 %.

b - Méthode de l'hématine alcaline

- Réactifs : Solution de soude 0,1 N
Solution d'ammoniaque à 10 %

- Technique : On ajoute 0,1 ml de solution à doser à 10 ml de Na OH O,1 N additionné de quelques gouttes d'ammoniaque à 10 %. Après quelques minutes, (5 minutes pour Hb A, 10 minutes pour Hb F à 37°) la coloration rouge de l'Hémoglobine, est transformée en une coloration brune, due à l'hématine. Le coefficient d'extinction de cette solution d'Hb correspondante est calculée en se rapportant à une courbe étalon.

c - Méthode par Réduction

On réduit l'Hémoglobine par $S_2 O_4 Na_2$. Après addition d'ammoniaque à 0,04 %, le coefficient d'extinction est mesuré spectrophotométriquement à 556 mμ

d - Méthode à la Cyan-méthémoglobine

Principe : L'Hémoglobine est oxydée par le ferricyanure de potassium en Méthémoglobine, et celle-ci est transformée par le cyanure de potassium en cyanméthémoglobine, qui donne un spectre caractéristique.

Deux variantes à cette méthode :

Technique de CROSBY

- Réactifs : Solution de K C N à 10 %
  Solution de $K_3 Fe (CN)_6$ à 10 %

- Réaction : 1 ml de sang est mélangé à 20 ml d'eau distillée. On ajoute trois gouttes de solution de $K_3 Fe (CN)_6$. On laisse l'oxydation se poursuivre pendant 5 minutes, puis on ajoute 2,5 ml de solution de KCN. On complète à 100 ml avec de l'eau. On passe au spectrophotomètre à 540 mμ La concentration en gramme % est obtenue par la formule : $C = \frac{E}{11,5} \times 16\,700 \times 10$, formule dans laquelle E = coefficient d'extinction - C = Concentration en g. % - 11,5 = coefficient d'extinction millimolaire à la longueur d'onde considérée - 16 700 = 1/4 du poids moléculaire de l'Hémoglobine.

- Technique de DRABKIN

Réactif : carbonate acide de potassium: 1,00g
cyanure de potassium : 0,052 g
Ferrycyanure de potassium: 0,198 g
Eau distillée : q. s. p. Un litre.

- Réaction : Mettre 0,02 ml de solution à doser dans 6 ml de réactif de DRABKIN. Agiter. Attendre quelques minutes et passer au spectrophotomètre à 530 - 540 mμ . Faire un "blanc" avec du réactif de DRABKIN puis se reporter à une courbe étalon pour connaître le taux d'Hémoglobine.

Remarque : Cette méthode très rapide peut se pratiquer indifféremment sur des échantillons d'Oxyhémoglobine ($Hb O_2$), de carboxyhémoglobine (Hb CO) ou de Méthémoglobine (Hb O4). Seules les solutions de sulfhémoglobine ne peuvent convenir.

e - Dosage Ferrocolorimétrique

Méthode de WONG

Cette méthode est basée sur le fait que la molécule d'hémoglobine contient une quantité connue de Fer (0,34 %).

Le fer est libéré par action combinée de l'acide sulfurique concentrée et du persulfate d'ammonium sans destruction complète de la matière organique. Après défécation trichloracétique le dosage est réalisé colorimétriquement à l'état de sulfocyanate ferrique en milieu alcoolo-cétonique qui renforce

et stabilise la coloration. Cette méthode décrite dans les fiches techniques de FLEURY (1955) est relativement longue.

III - Transformation Eventuelle de la Solution d'Hémoglobine.

En fonction des tests à effectuer, il peut être intéressant de travailler sur des solutions d'Oxyhémoglobine (Hb O_2) ou de Carboxyhémoglobine (Hb CO). La solution de départ est constituée par Hb O_2. Mais avec le temps, il se forme de la Méthémoglobine. Ceci peut être évité en maintenant la solution au congélateur, si on ne peut l'utiliser immédiatement.

Pour obtenir de la Carboxyhémoglobine il suffit de faire passer sur la solution précédente un courant d'oxyde de carbone pur (lequel peut être obtenu facilement par action de l'acide Sulfurique concentré sur l'acide formique.

B - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.

I - Résistance à la Dénaturation Alcaline R. D. A.

C'est essentiellement sur l'étude de la résistance des Hémoglobines et de leurs dérivés à la dénaturation alcaline que repose la mise en évidence du pigment fœtal dans le sang.

1° - Principe - Les deux constituants de l'Hémoglobine se dissocient en milieu fortement alcalin ; la globine s'y dénature et se combine alors à l'hématine pour donner naissance à la cathémoglobine. La cinétique de la formation de celle-ci, pratiquement identique à celle de la dénaturation de la protéine, peut être suivie spectrophotométriquement. Dans le cas d'hémoglobines humaines oxygénées de l'Adulte et du fœtus, la totalité de la première est dénaturée en une minute, à 20° C et à pH = 12,8 tandis que la seconde ne l'est alors pratiquement pas ; aussi leurs proportions respectives peuvent elles être dosées dans un mélange en étudiant le taux de cathémoglobinisation du pigment total déterminé dans des conditions expérimentales bien définies. Dans Hb O_2 normale, la R. D. A. varie de 0 à 2 %. Chez le nouveau né la R. D. A. varie de 60 à 80 %.

2° - Technique - Deux catégories de techniques sont ici proposées : soit des méthodes spectrophotométriques, soit des méthodes par précipitation.

a) Méthodes par précipitation

- Technique de SINGER
- Réactifs : Solution de NaOH N/12 - au réfrigérateur -
Solution précipitante : 800 ml de solution saturée de $SO_4 (NH_4)_2$ + 2ml ClH 10N.

- Réaction : 1,6 ml de solution alcaline est placée quelques minutes au bain-marie à 20°C. Ajouter alors 0,1 ml de la solution d'Hémoglobine (ajustée à 10 g.%) la pipette est rincée et le tube agité 10 secondes. Un chronomètre est déclenché au moment où l'Hémoglobine est introduite dans la solution alcaline. Au bout d'une minute très exactement ajouter 3,4 ml de la solution précipitante. Le mélange est immédiatement filtré. Déterminer la valeur de la fraction alcaline résistante en passant au spectrophotomètre à 540 mμ avec un témoin formé par 10 ml d'eau plus 0,04 ml de solution d'Hb. Exprimer sa valeur en pourcentage de la quantité initiale d'Hémoglobine.

- Technique de DERRIEN & LAURENT

Cette technique permet de travailler sur des solutions d'Hémoglobines moins concentrées ($<$ 10 g.%).

Réactifs : Solution de KOH N/10
Solution Tampon à pH 6,5 équimoléculaire 3,5 de phosphate mono et dipotassique.
(304,5 g. de $PO_4 HK_2$ + 238 g. de $PO_4 H_2K$ p. litre)

- Mode Opératoire : Opérer à 20 ± 1°.

	Tube 1	Tube Témoin
Sol. d'Hb à 3 %.....	0,5 ml	: 0,5 ml.
KOH N/10.....	1,6 ml	:

Laisser en contact une minute exactement.

Eau distillée.....		: 1,6 ml.
Tampon.....	3,4 ml	: 3,4 ml.

Filtrer - lire la densité optique. Le rapport :

$$\frac{\text{DO du Tube 1}}{\text{DO du Témoin}} \times 100 \text{ donne la RDA \%}$$

- Technique de BETKE

Il s'agit d'une modification de la méthode SINGER et qui permet d'évaluer de petits pourcentages d'Hb RDA (de0,5 à 2,0 %).

Dans un bain-marie à 20-22° on mélange dans un tube à essai 2,8 ml de solution de cyanméthémoglobine à 0,5 g. % avec 0,2 ml de soude 1,2 N. Au bout de deux minutes, on ajoute 2 ml de solution saturée de sulfate d'Ammonium. On mélange et on filtre au bout de quelques minutes. La transmission spectrophotométrique du filtrant est comparée avec une dilution identique de l'échantillon non dénaturé à 540 mμ.

Il est inutile d'ajouter de l'acide chlorydrique à la solution de Sulfate d'Ammonium. L'usage de cyanméthémoglobine a été préféré à l'oxythémoglobine par l'auteur, qui signale également qu'une cause d'erreur peut être la présence accidentelle de carboxyhémoglobine dans l'échantillon.

b) Méthode Spectrophotométrique

- Technique de JONXIS et VISSER
- Réactifs : Solution de soude 0,06 N.
  Solution d'Ammoniaque à 10 %.
- Réaction : 0,1 ml de sang ou de solution hémoglobinique (à 10 g. %) est diluée avec 10 ml d'eau distillée. On ajoute deux gouttes de solution d'ammoniaque à 10 %. On mesure la densité optique de cette solution au spectrophotomètre à 576 mμ ; soit E_b le volume de cette densité optique. 0,1 ml du même sang est maintenant dilué avec 10 ml de Na OH 0,06 N et deux gouttes de NH_4 OH à 10 %.

Chaque minute, spécialement entrè 5 et 15 minutes, on mesure la densité optique ; soit E_T cette valeur. Ensuite, la solution est placée au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes. Après refroidissement on mesure à nouveau la densité optique : soit E_e. Le rapport Eb/Ee doit être constant.

Le pourcentage de la fraction d'Hémoglobine, non dénaturée à un moment donné, peut être calculé par la formule :

$$\frac{E_T - E_e}{E_b - E_e} \times 100$$

Parmi les autres techniques permettant la mise en évidence de l'Hb F(ou Hb RDA) dans un sang humain, citons la technique cytologique. Nous verrons plus loin les techniques de spectrographie d'Absorption et les techniques immunochimiques.

II - Solubilité des Hémoglobines dans les sels Neutres

ROCHE & DERRIEN (55) utilisèrent les premiers cette technique pour démontrer l'hétérogénéité des Hb A et F. ITANO (37) puis ROCHE & DERRIEN (56) ensuite GOLDBERG (26) l'appliquèrent à quelques Hb anormales et plus particulièrement à la différenciation des Hb S et D qui ont un comportement identique en électrophorèse sur papier et chromatographie sur Amberlite.

1° - Technique de ROCHE & DERRIEN

- Solution Tampon de pH 6,5 et de concentration 3,5 M.

(PO_4 H_2 K. ..... 476 g.

(PO_4 HK_2 ..... 609 g.

(Eau distillée q.s.p. 2000 ml.

- Préparation de la Solution Hémoglobinique

On utilise une solution de carboxyhémoglobine renfermant 50 % en volume de tampon pH 6,5 et telle que leur dilution au dixième ait sous 1 cm d'épaisseur une densité optique de 1,0 pour une longueur d'onde de 550 mμ . Ceci correspond à une teneur en pigment de l'ordre de 0,15 %.

- Mode Opératoire

On prend une série de flacons jaugés de 50 ml. On verse dans chacun N cm^3 de Tampon (N variant de 0 à 9) et 9 - N cm^3 d'eau bidistillée.

On obtient ainsi une gamme de concentrations salines croissantes. On ajoute alors, dans chaque flacon, 1 ml de la solution Hb CO. Les flacons bouchés et bien agités sont placés au bain-marie à 24°C pendant trois heures. Au terme de cette équilibration, le contenu de chaque flacon est filtré sur des disques de papier. Les filtrats doivent être parfaitement limpides. Dans le cas contraire, recommencer la filtration.

La densité optique des filtrats est mesurée sous un cm d'épaisseur et à 550 mμ au spectrophotomètre.

On peut alors tracer une courbe en portant en abscisses la concentration C % en volume de la solution tampon et en ordonnées S la concentration de Hb CO dans la solution. Cependant on obtient des courbes plus représentatives, en portant en ordonnées ΔS la variation de la quantité de Hb CO par l'augmentation d'une unité de concentration, en mélange tampon ($\Delta S / \Delta C$ pour C = 1).

2° Technique d'ITANO

Cette technique plus simple, mais aussi moins fine que la précédente, permet de différencier l'Hb S de l'Hb D. En effet l'Hb S est très peu soluble dans les solutions salines, alors que l'Hb D y est très soluble.

- Solution Tampon de ph 6,8 et de concentration 2,24 M.

($PO_4 H_2 K$..... 160 g.

(PO_4 H K_2 ..... 212 g.
(Eau distillée q.s. ..... 1000 ml.

- Solution Hémoglobinique

ITANO utilise une solution d'Oxyhémoglobine préparée selon la méthode générale et titrée à 10 g. % environ.

- Mode Opératoire

Dans un ballon jaugé de 10 ml dissoudre 100 mg de S_2 O_4 Na_2, dans 8 ml de tampon phosphate. Recouvrir ce mélange par 1 ml d'eau distillée. On ajoute alors un volume de solution d'Hb O_2 tel qu'il contienne 50 mg d'Hb. Le ballon est plongé dans un bain-marie à 25° C pendant 15 minutes. On complète ensuite à 10 ml avec de l'eau distillée et on mélange avec soin. S'il y a de l'Hb S, la solution est trouble. On filtre et on passe le filtrat au spectrophotomètre. La densité optique sera inversement proportionnelle à la quantité d'Hb S présente dans la solution.

Dans le cas où la fraction anormale est une Hémoglobine autre que S (D ou G par exemple), la solution reste parfaitement limpide.

C - TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

I - Techniques d'Electrophorèse

Les premières études, sur le transport électrique de substances dissoutes, furent entreprises par le Physicien HITTORF en 1853, par Olivier LODGE en 1886. Mais, ce n'est qu'en 1889 que W. HARDY, fondateur de la Chimie des Colloïdes, créa l'expression "Cataphorèse". En 1909, L. MICHAELIS désigne par "Electrophorèse" la migration d'ions colloïdaux dans un champ électrique. Il est devenu d'usage de désigner par "Ionophorèse" tout déplacement d'ions sous l'influence d'un champ électrique, et par "électrophorèse" tout déplacement de colloïde.

On a réservé au dispositif de TISELIUS-PHILBOT et SWENSON, l'expression d'électrophorèse libre ou classique. Le terme "Electrophorèse de Zone" s'appliquant aux techniques utilisant un support poreux (papier, amidon, gélose).

1° - Electrophorèse Libre selon TISELIUS (2 - 47)

a - Historique & principe

En 1907, FIELD & TEAGUE isolaient la toxine et l'antitoxine diphtérique en mettant à profit la différence de leurs vitesses de migration dans un champ électrique. En 1926, KENDALL - JETTE & WEST appliquaient le même principe à l'étude des terres rares.

C'est en 1937 que TISELIUS précise les modalités opératoires permettant un emploi plus étendu de l'électrophorèse.

On recouvre de solution tampon, un mélange de protéïnes déposé dans un tube en U de NERNST. Avec le passage du courant électrique, les diverses fractions protéïniques se placent de façon différente dans le tube.

On procède à l'enregistrement optique des différentes couches ainsi apparues ; pour cela on met à profit le principe de TOEPLER pour la mesure de la réfraction.

Il a été réservé à LONGSWORTH et à ses Collaborateurs d'appliquer cette méthode, à des problèmes de médecine générale. Par la suite on a amélioré ce procédé. MOORE & WHITE remplacent la mesure de la réfraction, par des mesures interférométriques d'après les dispositifs de JAMIN & MICHELSON. En même temps, les quantités de substance soumise à l'expérience, passaient de 100 à 10 mg : la microélectrophorèse était née.

b - Technique Générale

La solution protéïque étudiée est tout d'abord soumise à la dialyse, contre une solution tampon de pH convenable (8,6). Cette opération préliminaire a pour but de mettre en parfait équilibre les ions non protéïques dans la solution étudiée et dans le tampon qui sera en contact, dans l'appareil de TISELIUS, pendant l'électrophorèse. L'appareil de TISELIUS grâce à un dispositif ingénieux, permet de superposer dans un tube en forme de U, la solu-

tion hémoglobinique et le tampon qui se trouvent séparés par une frontière bien délimitée et très nette. Le tampon contenu dans chacune des branches du tube en U est en continuité avec le même tampon contenu dans un vase où plonge l'une des deux électrodes (Ces masses de Tampon, empêcheront dans le tube en U, les variations de pH que pourraient occasionner les produits de l'électrolyse). Tout l'ensemble est plongé dans de l'eau maintenue au voisinage de + 3°5 C. (température inférieure à celle qui correspond au minimum de densité de l'eau + 4°C). Cette précaution évite des perturbations de la frontière, par les mouvements de convection que provoquerait sans cela l'échauffement du liquide par effet JOULE.

Chacune des branches du tube en U a une section rectangulaire et ses faces antérieures et postérieures, sont constituées par des glaces à faces parallèles, qui permettent l'observation des déplacements de la frontière, par un système optique de PHILBOT & SWENSON. Ce système permet d'obtenir à chaque instant un cliché photographique sur lequel la frontière entre solution protéique et solution tampon est décelée par une courbe en forme de clocher. Les déplacements de la frontière, sous l'influence du champ électrique seront ainsi suivis avec précision.

c - Interprétation des Résultats

Si la solution étudiée, ne contient qu'une fraction hémoglobinique, la courbure conservera l'aspect d'un clocher unique, qui se déplacera, mais ne se subdivisera pas.

Si la solution étudiée contient plusieurs hémoglobines de mobilités différentes, leurs frontières respectives chemineront avec des vitesses variées et après un certain temps, le cliché comportera autant de clochers distincts.

Enfin, si les mobilités respectives des fractions hémoglobiniques sont peu différentes, les clochers ne se distinguent plus aussi nettement. On observe un cliché bifide ou même simplement un clocher dissymétrique.

Pour qu'une hémoglobine puisse être considérée comme électrophorétiquement homogène, il faut que le clocher reste unique et symétrique, dans des tampons de forces ioniques et de pH divers. Signalons enfin, que dans le cas où les clochers sont bien distincts on a une idée assez bonne des proportions relatives des fractions correspondant aux diverses frontières, car les surfaces des clochers sont à peu près proportionnelles aux concentrations respectives d'hémoglobines correspondantes. Ceci n'est pas vrai dans le cas des clochers bifides ou assymétriques.

d - Application aux Hémoglobines

Ce sont PAULING et ses Collaborateurs, qui, les premiers utilisèrent cette technique, pour les Hémoglobines, en 1949.

Les tampons utilisés couramment, pour la recherche des Hb anormales, sont des tampons acides ou alcalins, de force ionique O,1. Pour la sépa-

ration des Hb A et F (9) on abaisse à 0,03 la force ionique du tampon phosphate disodique de ph 8,2.

De meilleurs résultats ont été obtenus avec un tampon cacodylique de force ionique = 0,02 et de pH = 6,5. A l'inverse du cas précédent l'Hb F est ici légèrement plus rapide que l'Hb A.

En France cette technique a été reprise et modifiée par DERRIEN & REYNAUD (19). Ces auteurs partent du fait que l'abaissement de la force ionique du solvant, a pour effet d'élever le potentiel électrocinétique des macromolécules électrolytiques et, par là, leur vitesse de migration dans un champ électrique la différence absolue de mobilité de deux protéïnes de charge voisine, peut alors atteindre une valeur suffisante pour que leur individualité électrophorétique puisse se manifester dans leur mélange.

DERRIEN & REYNAUD ont ainsi démontré l'hétérogénéité du pigment hémoglobinique d'adulte normal. Travaillant en tampon de faible concentration ionique et de pH inférieur au point isoélectrique de la protéïne, ces auteurs ont obtenu cinq fractions à partir d'une solution de Carboxyhémoglobine (Hb CO). Ces fractions numérotées de 1 à 5 dans l'ordre de mobilité croissante, ont été retrouvées aussi bien en électrophorèse, en tampon cacodylique (force ionique 0,0175 M, Ph = 6,5) qu'en tampon acéto-acétique, ou même en simple solution de Chlorure de Sodium. De ces cinq constituants, les fractions 3 et 4 représentent la quasi totalité de l'Hémoglobine et ont été reconnues comme étant bien un chromoprotéïde. La fraction 5 semble s'identifier à de l'Hb F ; quant aux traces 1 et 2, elles représen-

tent les protéïnes d'accompagnement X et Y.

2° - Electrophorèse de Zone

Si la technique de l'Electrophorèse libre donne des résultats intéressants, elle n'en reste pas moins longue et délicate, ce qui lui interdit de devenir une Méthode de Routine.

On s'est alors efforcé de la rendre plus accessible. On a cherché en particulier, à immobiliser l'électrolyte au sein des substances solides. Tour à tour ont été utilisés, le coton de verre, l'agar-agar, la gélatine, les fibres d'amiante, le gel de silice, l'amidon, les fines perles de verre calibrées et aussi, bien sûr, le papier filtre.

a - Electrophorèse sur papier

Ce sont KONIG et VON KLOBUSITZKY (42) qui les premiers utilisèrent le papier filtre comme support. C'est en poursuivant une étude sur le pigment jaune de venin de serpent, que ces auteurs furent amenés à pratiquer, dès 1939, l'électrophorèse sur bandes de papier, imprégnées d'une solution d'électrolyte.

En ce qui concerne l'électrophorèse sur papier des Hémoglobines, on a utilisé un nombre assez important de techniques qui toutes, ont donné de bons résultats.

Nous nous bornerons ici, à indiquer les différents facteurs intervenant dans ces techniques, et ensuite la technique que nous avons utilisée,

réservant à un chapître ultérieur, les raisons qui nous ont guidés dans notre choix.

- Appareillage

Deux techniques se sont affrontées ici, en ce qui concerne la disposition de la bande de papier : soit placée sur un chevalet soit placée horizontalement.

- Electrophorèse Verticale

Les bandes de papier sont placées sur un support de forme triangulaire ; les deux cuves contenant le tampon se trouvant à la base du triangle. Cette disposition est la même que celle des premiers appareils servant à l'électrophorèse du sérum. LEHMANN reste très attaché à ce procédé, ainsi que la plupart des Anglo-Saxons.

- Electrophorèse Horizontale

Dans cette technique s'est immédiatement posé le problème de la fixation du papier. Celui-ci en effet, alourdi par son humidification préalable, a tendance à former en son centre, une poche, qui peut entraîner une modification dans la migration donc fausser les résultats.

Quatre procédés sont utilisés :

- Papier tendu par simple adhérence sur des cornières en matière plastique (GRASMANN et HANNIG).

- Bande de papier sur un support continu.
- Papier tendu et maintenu entre deux plaques rigides, (HUISMANN). Dans ce cas les mouvements du tampon dans le papier sont modifiés.
- Papier tendu grâce à des tubes de verres remplis de mercure (CABANNES).

Les électrodes sont en général des électrodes en platine.

En ce qui concerne le générateur de courant continu, il existe dans le commerce, des redresseurs stabilisés, soit en Intensité soit en différence de potentiel et qui donnent entière satisfaction.

b -Le Papier

Le papier utilisé pour l'électrophorèse d'Hémoglobine doit être assez fort. Les meilleurs résultats sont obtenus avec du papier pour chromatographie WHATMAN 3 MM - ARCHES 304 - SCHLEICHER et SCHULL 2040 ou 2043.

- Solution Tampon

L'Electrophorèse est effectuée à des pH différents, variants de 6,5 à 9,2. On peut les subdiviser en deux groupes :

- les électrophorèses à pH acide de 6,5 à 7,0
- les électrophorèses à pH alcalin de 7,2 à 9,2.

Les solutions tampons les plus utilisées pour l'électrophorèse d'Hb sur papier, sont les suivantes :

- Tampon à ph 9,2 force ionique 0,02 (ITANO)
  (Véronal sodé : ..... 4,2 g.
  (Eau distillée q.s.p. . 1 l.
- Tampon à ph 8,6 force ionique 0,05
  (Véronal sodique .....20,6 g.
  (Véronal acide ..... 3,68 g.
  (Eau distillée q.s.p. . 2 l.
- Tampon à ph 7,8 force ionique 0,05
  (PO_4 H2 Na H2 O .... 0,587 g.
  (PO_4 H Na2 ..... 6,500 g.
  (Eau distillée q.s.p.. 2 l.
- Tampon à ph 6,5 force ionique 0,045
  (PO_4 H_2 K..... 3,11 g.
  (PO_4 H Na2 ..... 1,49 g.
  (Eau distillée q.s.p.. 1 l.

Suivant les auteurs, la force ionique des solutions Tampons varie. Ainsi CABANNES et PORTIER (11) utilisent un tampon véronal de pH 8,6 de force ionique 0,025 à 0,020 M, et un tampon phosphate de pH 6,5 et de force ionique 0,07 M.

- Temps d'Electrophorèse et Champ Electrique

Si l'on parcourt les différentes techniques préconisées, on s'aperçoit qu'en plus des variations portant sur les facteurs précédemment décrits, les méthodes diffèrent par de nombreux autres points. Nous citerons avant tout l'intensité du champ électrique et le temps d'électrophorèse. Ces deux facteurs varient en sens inverse l'un de l'autre. En effet, plus le voltage est élevé, et plus le temps nécessaire à une bonne séparation est court.

Cependant, après une préférence nette pour les temps d'électrophorèse assez longs, sous bas voltage (ITANO : 16 à 18 heures, sous 150 à 200 volts, pour des feuilles de papier de 20 cm), il semble que la plupart des auteurs se soient ralliés à des temps d'électrophorèse assez courts (de 3 à 6 heures) pour des différences de potentiel moyennes (300 à 400 volts pour des feuilles de 20 cm).

- Temps final : Séchage ou Coloration ?

Les spots obtenus étant apparemment bien colorés, certains pensent qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une coloration pour faire une interprétation immédiate. Celle-ci cependant, ne se fait qu'après sèchage de la bande de papier. Cette opération entraîne des distorsions et des déplacements des spots, qui sont susceptibles de fausser les résultats. De plus, on s'est vite aperçu, que certaines fractions présentes en quantité minime (cas de Hb A2) pouvaient échapper à la lecture.

Pour toutes ces raisons, et aussi pour pouvoir conserver plus longtemps les résultats, on préfère colorer les bandes humides dès la fin de l'électrophorèse.

- Coloration des Protéines.

- Coloration au Bleu de Bromophénol

Colorant
(Bleu de Bromophénol 4 g.
(Sublimé.....80 g.
(Alcool à 95°.....800 g.

- Technique

Plonger le papier à la sortie de l'électrophorèse, dans le colorant, pendant une minute. Laver ensuite à l'eau, jusqu'à décoloration complète du papier. Sécher verticalement à la température du Laboratoire. Les fractions hémoglobiniques apparaissent colorées en bleu.

- Coloration à l'Amido-SCHWARTZ :

Colorant (Amido SCHWARTZ.. 1 g.
(Acide Acétique..... 10 g.
(Méthanol..... 90 g.

- Technique

Plonger le papier dès la fin de l'électrophorèse dans le colorant, pendant une minute. Décolorer ensuite le papier par immersion dans des bains contenant un mélange à parties égales de Méthanol Acétique à 10 % et d'Eau Distillée. Sécher comme précédemment.

- Coloration Spécifique des fractions hémoglobiniques

C'est la coloration à la Benzidine :

- Benzidine base (ou chlorydrate)... 1 g.
- Eau à 80°..... 30 ml
- CH_3 COOH à 20 % dans l'eau..... 100 ml

On trouvera d'autres formules utilisant la Benzidine dans le paragraphe consacré à l'élec-

trophorèse en Gel d'Amidon.

- Technique utilisée dans nos études

- Appareillage - Nous avons utilisé des cuves horizontales équipées selon la technique CABANNES précédemment décrite. Le générateur est un redresseur capable de débiter 400 V. sous 10 mA et stabilisé en intensité.

- Solution Tampon : Pour des raisons que nous expliquerons dans un chapitre ultérieur , la solution tampon utilisée pour le dépistage est un mélange véronal-véronal sodique de pH 8,6 et de force ionique 0,02. Nous complétons l'analyse, par une électrophorèse en tampon à pH 6,5.

- Temps et champ électrique : 300 volts pendant quatre heures.

- Papier : Nous avons employé principalement le papier WHATMANN 3MM. en feuilles de 36 cm x 18 cm.

- Technique

La solution tampon versée dans les cuves, est mise au même niveau. Le papier est imprégné de tampon, puis séché légèrement. La solution Hémoglobinique est appliquée sur la ligne de départ tracée à 11 cm du bord du papier.

Le papier est ensuite installé sur le support, tendu par les masselottes et l'ensemble est placé dans l'appareil. On s'assure que les bords du papier trempent bien dans la cuve et que les électrodes sont correctement placées. Après avoir recou-

vert la cuve par une plaque de verre, on fait passer le courant électrique, réglé au voltage désiré.

A la fin de l'opération, on pratique la coloration, comme décrit précédemment. Il ne reste alors qu'à interpréter les résultats. Cette interprétation sera facilitée par l'adjonction d'Hb témoins en même temps que les échantillons à étudier.

La position prise par les différentes fractions hémoglobiniques au cours de ces électrophorèses (en tampon acide et en tampon alcalin) sont schématisées dans un tableau à la fin de ce chapitre.

b - Electrophorèse sur Gel d'Amidon.

Cette technique fut décrite pour la première fois, par O SMITHIES en 1955 (66) elle ne doit pas être confondue avec d'autres méthodes, plus anciennes qui utilisent l'amidon, mais sous une forme physique différente de celle du gel.

Cette technique de réalisation assez délicate, tout au moins en ce qui concerne la préparation du gel, permet une séparation plus fine, des fractions hémoglobiniques.

Comme pour l'électrophorèse sur papier, de nombreuses variantes à la technique de SMITHIES ont été proposées. Les principales portent sur les solutions tampons et les colorants. Nous allons examiner les différents temps de l'exécution de cette électrophorèse, puis nous décrirons la

méthode que nous avons utilisée.

- Appareillage

Le générateur de courant continu est le même que celui utilisé pour l'électrophorèse sur papier. Les cuves peuvent être les mêmes ainsi que les électrodes.

Le Gel d'Amidon est coulé dans des cuves dont le modèle varie avec les utilisateurs. Nous utilisons des cuves rectangulaires en matière plastique de 20 cm de long sur 5 cm de large et 6mm de profondeur. Ces cuves sont constituées de deux pièces identiques de 3mm d'épaisseur, superposées. L'une d'elles est collée sur le fond, l'autre est mobile, mais maintenue en place par deux tiges sur lesquelles elle s'enfonce. Cette disposition permet, en fin d'opération, de découper le gel en deux parties. L'ensemble est recouvert par un couvercle en même matière, ou simplement par un papier de cellophane ou une feuille de plastique.

- Solution Tampon

Les principales solutions Tampons utilisées sont les suivantes :

- Tampon borate pH= 8,9 (Acide Borique..... 1,86g.
  (NA OH N..... 10ml
  (Eau distillée q.s.p.. 1 l.

- Tampon borate pH= 7,2 (Tampon pH 8,9.... 1250ml
  (Acide borique à 25% 600ml

- Tampon véronal pH=8,6 (Véronal acide..... 5,5 g.
  (Véronal sodique... 10,3g.

(Eau distillée q.s.p. 1000 ml.

- Tampon "TRIS" (pour préparation du Gel) :

(TRIS..... 3,0 g.
(EDTA..... O,39 g.
(Acide borique..... 2,50 g.
(Eau distillée q.s.p. 1000 ml.

- Obtention du gel d'Amidon

La qualité de l'Amidon, hydrolysé au préalable, est d'une importance capitale. Des auteurs tels que MORETTI - BOUSSIER et M. F. JAYLE (48) préparaient eux-mêmes l'amidon servant à la confection du Gel. Mais cette préparation est longue et le terme de l'hydrolyse est très difficile à saisir.

Il existe actuellement dans le Commerce, de l'amidon, préalablement hydrolysé, pour électrophorèse.

Pour préparer le Gel d'amidon, nous utilisons la technique suivante :

Peser 14,9 g. d'amidon, déjà hydrolysé, (Amidon hydrolysé Connaught pour Electrophorèse en Gel) auquel on ajoute 120 ml de solution tampon. Mettre le mélange dans un erlenmeyer. Agiter. Porter à la flamme d'un bec bunsen en agitant fortement. On arrive au stade empoi d'amidon, c'est à dire à un mélange de consistance épaisse et opaque. On continue à chauffer, le liquide devient plus

fluide, plus transparent. Juste avant que ce "gel" soit à ébullition on cesse de chauffer, puis les bulles d'air sont éliminées par passage à la pompe à vide. On coule immédiatement dans les cuves. On laisse refroidir jusqu'à la prise en masse. Deux heures suffisent largement. Il faut éviter de laisser le gel à une température égale ou inférieure à 0°C, car il subit des modifications structurales, qui le rendent impropre à son utilisation en électrophorèse.

Quand on opère avec des tampons acides, le pH du gel est identique à celui du tampon employé. Avec des tampons basiques il diminue de 0,4 environ.

Après avoir coulé le Gel d'Amidon dans la cuve, on prend soin de placer des ponts de papier filtre aux extrémités de celle-ci. Ces papiers trempant dans les cuves contenant le tampon, permettront le passage du courant électrique.

Insertion de l'Echantillon d'Hémoglobine

Deux méthodes peuvent être utilisées.

Le papier filtre : On découpe dans du papier WHATMANN des petits rectangles d'environ 3 x 10mm On dépose sur le papier la solution d'Hb à étudier. On sèche légèrement. On pratique dans le gel, perpendiculairement à sa surface de petites incisions, avec une lame de rasoir. On y insère le papier imbibé d'Hb et on ramène les deux lèvres de l'incision, en éliminant toute bulle d'air. On peut alors, faire l'électrophorèse.

L'insertion directe. On découpe dans le gel une petite tranchée de 1mm x 1mm. On y dépose la

solution hémoglobinique qu'on laisse diffuser. On recouvre ensuite par du Gel d'amidon ou un peu d'amidon mélangé à du Tampon.

- Electrophorèse et Champ électrique

Comme dans l'électrophorèse sur papier, les deux facteurs sont étroitement liés : HUISMANN & JONXIS (40) font migrer, pendant 15 heures, sous 300 à 350 volts, dans le cas d'un tampon véronal à pH 8,6, CABANNES estime suffisante, une migration de 12 heures, sous différence de potentiel de 200 volts, mesurée au papier. On peut effectuer une électrophorèse verticale ou une électrophorèse horizontale.

- Coloration

On peut utiliser deux techniques complémentaires. D'abord une coloration classique à l'Amido SCHWARTZ, en utilisant exactement la technique décrite pour l'électrophorèse sur papier.

Ensuite la coloration à la Benzidine.

Cette coloration à la Benzidine est basée sur une réaction caractéristique des Hb : les Hb développent une activité péroxydasique, et cette péroxydase, en présence de la Benzidine, donne une coloration bleue. Cette réaction spécifique permet de différencier dans une électrophorèse, les fractions d'Hb d'autres fractions, d'origine protéïque. En effet, si au Bleu de Bromophénol toutes les bandes sont colorées, à la Benzidine seules les bandes correspondant à des Hémoglobines seront teintées en bleu.

Voici les différentes formules de colorant, proposées, ainsi que les techniques utilisées :

- Benzidine base (ou chlorydrate)..... 1 g.
- Eau à 80°..... 30 ml.
- CH_3 COO H à 20° dans l'eau.....100 ml.

Coloration FESSAS

- Méthanol..... 70 ml.
- CH_3 COO H 8,2 % (1,5 M)..... 5 ml.
- CH_3 COONa 20,4 % (1,5m)..... 5 ml.
- Eau distillée..... 20 ml.
- Benzidine fraichement dissoute.....100 mg.

Après que le gel a séjourné 10 à 15 mn dans ce bain, ajouter 0,8 ml d'Eau Oxygénée à 110 vol. Laver ensuite avec la solution suivante :

- Méthanol..... 70 ml.
- CH_3 COOH (1,5 M)..... 5 ml.
- CH_3 COO Na (1,5 M)..... 5 ml.
- Eau distillée.....20 ml.

On peut compléter la coloration de FESSAS par addition de 100 mg/100 ml de Nitroprussiate de Sodium, dans le bain colorant. Ceci donne une teinte d'un noir profond aux zones d'Hb.

La bande de gel étant partagée en deux on pratique la coloration à l'Amido-SCHWARTZ sur une moitié et sur l'autre la coloration à la Benzidine. Ceci permet de révéler spécifiquement l'Hb ainsi que les fractions protéïniques non Hb.

c - Electrophorèse sur Bloc d'Amidon

Cette technique a été décrite par KUNKEL et Coll. en 1957 (45) Ici, l'amidon n'est pas transformé en gel, mais simplement sédimenté dans du tampon. Cette méthode donne de bons résultats dans la caractérisation de l'Hémoglobine A_2 ainsi que dans la séparation des Hb H et BART'S, de l'Hb M, mais est surtout utilisée pour la préparation de fractions pures d'Hb. L'électrophorèse se fait avec un Tampon Véronal à pH 8,6 ou un tampon glycine pH 8,8 dans les mêmes conditions que sur papier. Cependant, l'intensité de courant et le temps d'électrophorèse sont plus importants pour obtenir des fractions suffisamment distinctes. Une fois l'électrophorèse terminée et les différentes fractions bien repérées, on découpe les différentes bandes et on élue sur entonnoir en verre fritté, en utilisant un tampon phosphate de pH 7,0 et de force ionique 0,001 M. Le pourcentage de chaque fraction peut être calculé en passant au spectrophotomètre à 540mμ ou colorimétriquement après adjonction du réactif de Folin (R. Phospho-molybdique).

d - Electrophorèse sur Gélose

Une technique d'électrophorèse sur gélose a été décrite par ROBINSON et Coll. en 1957 (57) mais elle avait été développée auparavent par GRABAR en 1955.

La gélose purifiée est mise en solution à 2 % à chaud dans le tampon. Celui-ci est un tampon borate à pH 6,5. Cette solution est coulée sur une plaque de verre et laissée jusqu'à solidification.

On y creuse alors des godets, dans lesquels on introduit la solution à étudier, mélangée à de la gélose en surfusion. Pour éviter l'évaporation due à l'effet Joule, on recouvre d'une couche de plastique l'ensemble de la préparation. Celle-ci est alors soumise à un courant électrique de 350 volts, pendant 14 à 16 heures. DEPIEDS & Coll. (17) réduisent le temps de l'électrophorèse à 5 - 6 heures.

Les spots sont révélés par une coloration à l'Amido-SCHWARTZ dans l'alcool acétique, suivant la technique de GRABAR.

La vitesse de migration des différentes fractions d'Hb est ici différente de celle observée en électrophorèse sur papier ou sur gel d'amidon.

e - Electrophorèse sur Acétate de Cellulose

Cette méthode a été utilisée pour la première fois par KOHN en 1957 (43).

Réactifs :

Tampon pH 8,6	(Véronal acide	1,56 g.
	(Véronal Sodique	12,76 g
	(Eau distillée q.s.p.	1000 ml.
Tampon TRIS	(Tris Hydroxyméthyl-amino-méthane	50,4 g.
	(E D T A	5,0 g.
	(Acide borique	3,8 g.
	(Eau distillée q.s.p.	1000 ml.
Colorant	(PONCEAU S	2 g.
	(Acide Trichloracétique	30 g.
	(Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Technique.

Les bacs à électrophorèse sont remplis de tampon véronal pH 8,6, sur une profondeur de 1,5 à 2 cm.

Les bandes d'Acétate de Cellulose ont 5 cm x 12 cm. La ligne d'application est marquée au crayon à 4 cm de l'extrémité de départ de la bande. On peut ainsi faire migrer 3 échantillons par bande. La bande d'Acétate de Cellulose est déposée sur la surface d'une solution Tampon Tris, diluée au 1/3. Les bandes s'imbibent seules, et sont retirées avec précaution au bout de 5 minutes. Elles sont séchées doucement entre deux papiers filtres.

La solution d'Oxyhémoglobine est diluée avec deux volumes de Tampon Tris, puis appliquée sur la bande avec une pipette très fine. La solution est déposée au pôle positif et on fait passer un courant de 160/180 volts pendant deux heures. On obtient parfois de meilleurs résultats en appliquant la solution au pôle négatif et en portant la d. d. p. à 300 volts pendant 1 heure.

A la fin de l'opération, les bandes sont immédiatement retirées de la cuve sans séchage et placées, la partie à colorer dirigée vers le bas, dans le colorant. On les y laisse 10 minutes. On les décolore ensuite à l'eau distillée.

Cette méthode permet surtout de séparer et de caractériser les fractions hémoglobiniques lentes, en particulier Hb A_2. Elle offre moins d'intérêt pour les fractions rapides.

f - Electrophorèse sur Gel Acrylamique

Ce nouveau support a été utilisé tout d'abord pour les protéïnes Sériques, par RAYMOND et ses Coll. (54). Son application à l'étude des hémoglobines fut proposée en 1962 par FERRIS et Coll. (22).

Le Gel est préparé par dissolution de 10 gr. de "Cyanogum 41" dans 150 ml d'une solution tampon Tris -EDTA Ac. Borique à pH 8,7 (la même que celle utilisée pour l'Acétate de Cellulose). On ajoute ensuite un ml de béta-diméthylaminopropionitrile (DMAPN) et 0,5 g. de Persulfate d'Ammonium. On complète à 200 ml avec le tampon et on agite.

On coule immédiatement le mélange dans les cuves en matière plastique. Le gel est prêt à l'emploi en 15 minutes. Les cuves sont placées dans une cellule verticale, à électrophorèse dont les compartiments à électrodes sont remplis par la même solution tampon.

Afin d'équilibrer le gel, on fait passer un courant électrique de 400 volts, pendant 15 mn. On dépose ensuite la solution hémoglobinique à étudier. On rétablit ensuite le courant de 400 volts pendant une heure.

FERRIS & Coll. (22) indiquent que la séparation des fractions hémoglobiniques est déjà apparente au bout de 20 à 30 mn et très bonne au bout d'une heure, ce qui en fait une méthode rapide. De plus, la transparence du Gel Acrylamique, peut permettre une évaluation quantitative des divers constituants par passage au densitomètre.

II - CHROMATOGRAPHIE

Les premiers travaux sur la Chromatographie des protéïnes ont fait appel surtout à l'adsorption physique de ces macromolécules sur des supports solides. La gamme des adsorbants a été rapidement élargie avec l'introduction des échangeurs d'ions et de la chromatographie de partage, sur colonne et sur papier, dans la séparation des protéïnes. Le comportement vis à vis des adsorbants de ces grosses molécules est assez complexe. Il est difficile, par exemple, d'éviter l'adsortion physique d'une protéïne sur une résine synthétique de sorte que si l'échange d'ions est le phénomène dominant, les forces de Van der Waals jouent un rôle non négligeable.

Le comportement chromatographique des Hémoglobines fut étudié pour la première fois par BOARDMAN et PARTRIDGE (6-7) en 1953. Ensuite de nombreuses techniques furent proposées, tant en chromatographie de partage, qu'en chromatographie d'adsorption. Nous allons étudier les principales d'entre elles :

1° - Chromatographie d'Adsorption.

Par définition, c'est une technique dans laquelle un courant de liquide provoque la migration différentielle des composants d'un mélange, à partir d'une zone initiale étroite, dans un milieu poreux doué de propriétés d'adsorption.

Dans le cas des Hémoglobines, ALTSCHUL et ses Collaborateurs (4) ont utilisé l'Alumine Al_2O_3 comme adsorbant dès 1939. Cependant cette méthode fut bientôt dépassée, car les techniques modernes utilisant les résines échangeuses d'ions, donnent de meilleurs résultats.

2° - Chromatographie par Echange d'Ions

Les échangeurs d'Ions sont des solides qui, lorsqu'ils baignent dans une solution saline, peuvent remplacer certains de leurs ions par ceux de la solution. Pratiquement ce sont des réseaux de macromolécules insolubles dans l'eau et les solvants organiques courants.

Les ions échangeables neutralisent la charge électrostatique portée par la protéine. Les échangeurs sont de nature minérale (naturelle ou synthétique) ou de nature organique. Dans ce dernier cas nous allons trouver les résines synthétiques qui ont permis l'étude plus complète des Hémoglobines.

a Chromatographie sur Amberlite IRC 50

Cette résine, échangeuse de cations, fut introduite dans l'étude des hémoglobines, par BOARDMANN & PARTRIDGE (6-7) puis reprise par HUISMAN & PRINS (32) qui en firent une méthode de routine.

Appareillage. Au début, HUISMAN & PRINS utilisaient des colonnes classiques, cylindriques de 13 x 0,9 cm. Par la suite ils adoptèrent des colonnes rectangulaires, plates, en lucite de 20x3x 0,5 cm.

Préparation de l'Amberlite. Deux techniques

Technique préconisée par LEHMANN (46) : Cet auteur se contente de laver la résine à l'eau distillée, jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Ceci demande d'ailleurs un volume important d'eau distillée.

Technique de HUISMANN (32) : Prendre 100 g. d'Amberlite et la laver à l'eau plusieurs fois.

Faire bouillir cette résine dans 300 ml de Na OH 4N pendant environ 10 heures, en agitant constamment, pour éviter les projections. Ceci peut se réaliser très facilement en montant au-dessus du ballon un réfrigérant à reflux (pour éviter toute perte d'eau par évaporation) et un agitateur électrique électro-magnétique.

Laver ensuite à l'eau distillée jusqu'à ce que le surnageant soit voisin de la neutralité. Il faut environ 15 à 20 litres d'eau pour arriver à ce résultat.

Ajouter alors à la résine 200 à 300 ml de Cl H 4N. Agiter un moment. Décanter et rejeter le surnageant.

Ajuster à pH 6,00 avec le tampon Citrate servant à la chromatographie.

Couler enfin dans les colonnes en tassant modérémment la résine.

Solution Tampon. On emploie généralement un tampon à pH = 6,00 ayant la constituation suivante:

(Citrate de Sodium : 147 g.
(Eau distillée..... 500 ml.

Ajuster ensuite à pH = 6,00 avec de l'acide Citrique et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Ce tampon est dilué au 1/10 au moment de l'emploi.

Fixation de la Solution Hémoglobinique.

On utilise une solution de 0,3 ml de Hb CO dans 4 ml d'eau distillée. Après avoir équilibré par passage de 25 à 30 ml de tampon verser la solution de Hb CO sur le haut de la colonne. Laisser passer puis mettre en place l'écoulement du développeur (Tampon Citrate à pH 6,00). Celui-ci doit avoir un débit de 15 à 20 ml/heure au maximum. Faire ainsi passer 200 ml de tampon.

On travaille à une température de + 4° à plus 6° pendant 10 à 12 heures.

Il est possible d'obtenir des résultats semi quantitatifs sur le pourcentage des différentes fractions hémoglobiniques en passant au densitomètre une photographie diapositive de la chromatographie. La marge d'erreurs est de l'ordre de 5 à 10 %.

Résultats . On utilise un tampon pH 6,00, c'est à dire de pH inférieur à l'isoélectrique des pigments. On confère ainsi à ces derniers une charge positive d'autant plus élevée, que l'écart des deux pH considérés est plus grand. Les Hb se comportent alors comme des cations et entrent en compétition avec les ions Na + du tampon pour se fixer sur les groupements acides libres de la résine, et l'on conçoit que l'intensité de l'adsorption sur cette dernière, qui règle leur vitesse de migration, soit fonction

directe de leur charge et fonction inverse de la concentration en ions alcalins du milieu.

Par ce procédé MORRISON & COOK (49) ont pu séparer l'oxyhémoglobine d'adulte, en trois fractions principales. Ils ont utilisé un tampon citrate de sodium - phosphate de sodium de pH 6,3 et de teneur croissante en ions Na+. Ils ont obtenu les mêmes résultats avec l'hémoglobine de nouveau né.

Par la suite, ALLEN, SCHROEDER et BALOG (3) ont repris ces travaux, mais en opérant avec un tampon phosphate mono et disodique de pH = 7,18 et de f. i. O,O625 M en Na+. Ils n'ont retrouvé que deux fractions pour Hb A et Hb F.

Cette technique appliquée aux hémoglobines anormales, a permis une très bonne séparation de la plupart d'entre elles. Comme cette migration se fait dans un ordre différent des techniques électrophorétiques, la chromatographie sur amberlite apporte de précieux renseignements pour l'identification des différentes fractions.

b - Chromatographie sur Carboxyméthylcellulose (C.M.W.)

Ce nouvel échangeur de cations a été préparé et utilisé pour la première fois par PETERSON et SOBER (52).

-Préparation : 60 g. de poudre de Cellulose (tamisée à travers un tamis de 325 mesh) sont agités dans une solution de 90 g. de Na OH dans 20 ml d'eau jusqu'à obtention d'une masse épaisse et friable. On refroidit cette masse dans un bain

de glace. On ajoute, peu à peu, 30 g. d'acide chloracétique en solution dans 40 ml d'eau en agitant bien. On chauffe 20 mn au bain-marie à 70°.

On obtient un produit jaune brique que l'on refroidit à nouveau dans un bain de glace. On ajoute 500 ml d'acide acétique à 10 %. On complète à deux litres avec de l'eau et on laisse sédimenter. On élimine le surnageant et on lave plusieurs fois à l'eau. On reprend enfin avec de l'eau et on acidifie par 10ml d'acide acétique glacial. On lave alors sur verre fritté jusqu'à neutralité. On essore et on lave le "gateau" avec 500 ml d'éthanol. On évapore l'excès d'alcool dans un dessicateur sous vide. On obtient environ 45 g. d'une poudre blanche contenant 0,7 milliéquivalent de groupe acide par gramme.

- Technique : Cette carboxyméthylcellulose est mélangée à un tampon citrate de pH 6,0 ou phosphate de pH 7,0 identiques à ceux utilisés pour la chromatographie sur amberlite. On utilise la même technique.

On observe, dans ce cas, des migrations légèrement différentes de celles obtenues sur amberlite.

c - Chromatographie sur Diéthylaminoéthyl-Cellulose.
(DEAE Cellulose)

Cet absorbant fut préparé pour la première fois par PETERSON et SOBER (52). A l'inverse des adsorbants précédents nous nous trouvons ici en présence d'un échangeur d'ions. En effet la cellulose ainsi activée contient des groupes basiques de la

triéthanolamine, elle-même liée à la cellulose par la réaction avec l'épichlorhydrine.

Ce support chromatographique a été utilisé dans la séparation des fractions anormales d'hémoglobines et surtout dans l'évaluation quantitative de l'Hb A_2 du pigment normal par HUISMAN & Coll. (30-31).

Voici la technique préconisée par ces auteurs :

Une quantité convenable de DEAE-Cellulose, type 40 (commercialisée par la BROWN COMPANY - BERLIN) est soigneusement équilibrée par lavage répété avec un tampon phosphate 0,005 M et de pH = 8,6 contenant 100 mg de CNK par litre. La DEAE Cellulose ainsi équilibrée, est placée dans des colonnes de 20 x 0,9 cm.

Avant d'être soumise à la chromatographie la solution d'hémoglobine est dialysée pendant 24 heures, avec la même solution tampon. 10 à 25 mg d'oxyhémoglobine sont ensuite chromatographiées.

Dans le cas de l'Hb A_2 celle ci est éluée par passage du tampon phosphate à un débit de 40 à 50 ml/heure. Les autres fractions hémoglobiniques sont éluées grâce à un tampon phosphate de force ionique 0,01 M et pH = 6,0 additionné de Cl Na 0,3 M. Le volume de la fraction A_2 est ajusté à 4 ml ; celui de la fraction principale à 200 ml et les densités respectives de ces deux solutions sont évaluées au spectrophotomètre à 415 mμ

Le pourcentage d'Hb A_2 est calculé en utilisant la formule :

$$\frac{A}{A + (B \times 50)} \times 100\ \%$$ dans laquelle

A = la densité optique de la fraction A_2
B = la densité optique de la fraction principale.

En outre, la pureté de l'Hb A_2 est contrôlée par électrophorèse en gel d'amidon.

Cette technique permet aussi l'évaluation quantitative des fractions S, E, C et quelques autres (25).

d - Chromatographie sur DOWEX 2.

Le DOWEX 2 est un échangeur d'anions, à base de polystyrène contenant des groupes ammonium-quaternaire. Cette résine fut utilisée par BOMAN, pour la première fois, (8) pour la séparation des protéïnes.

Dans le cas des hémoglobines humaines, on utilisait cette résine avec le tampon de GOMORI (27) Tris (hydroxyméthyl-amino-métane) acide chlorhydrique (THAM-HCL) de pH = 7,3 et f. i. 0,04 M au départ.

L'élution est faite en augmentant graduellement la concentration du tampon, sans changer le pH. On finit l'élution par HCL N qui régénère en même temps la colonne.

3° - Chromatographie de partage - La chromatographie sur papier

Cette technique utilisée depuis très longtemps, a été appliquée à l'étude des hémoglobines, en Italie, par SANSONE et CUSMANO (58) et aussi en France, par KRUH - DREYFUS et SCHAPIRA (44) dans sa formule unidimensionnelle. ANDERSCH (5) de son côté applique à la séparation des Hb la technique bidimensionnelle.

a - Epreuve unidimensionnelle

Technique de KRUH & Coll. (44) : Ces auteurs utilisent du papier Watmann n° 1 et comme solvant un tampon Acétate de Sodium-Véronal de pH = 4,3. Ils ont ainsi réussi à séparer les Hb A et F.

Technique de SANSONE et CUSMANO (58) :

La même différenciation des Hb A, F, est ici obtenue en prenant comme solvant de la pyridine contenant 10 % d'eau.

b - Epreuve bidimensionnelle

Technique de ANDERSCH (5) : Cet auteur soumet les Hb à une chromatographie sur papier, en utilisant comme solvant, une solution 1 M de saccharose, dans la première direction, et le mélange N-butanol-acide acétique-eau (20 - 3 - 75) dans la seconde direction.

Mais l'intérêt majeur de la chromatographie sur papier dans l'étude des fractions hémoglobiniques, réside bien plus dans l'étude des acides aminés de la globine, après digestion trypsique de la molécule d'hémoglobine. Cette technique intervient alors, soit seule, soit sous forme d'Electro-

chromatographie. C'est pour cette raison que nous étudions cette méthode, dans le paragraphe suivant qui sera consacré à l'Electro-chromatographie.

D - TECHNIQUES à la fois BIOCHIMIQUES & PHYSICO CHIMIQUES.

Les différences de comportement des pigments hémoglobiniques vis à vis de l'électrophorèse et de la chromatographie ont donné à penser aux Biochimistes, que ces variations ne pouvaient s'expliquer que par une structure chimique différente.

Nous ne reviendrons pas sur les travaux fondamentaux de RHINESMETH - SCHROEDER et MARTIN, qui découvrirent la structure de la Globine.

Partant de ces résultats, on s'est ensuite efforcé de localiser l'anomalie soupçonnée. C'est ainsi que l'on a pu tout d'abord préciser quelle chaine polypeptidique était anormale ensuite déterminer quel peptide de cette chaine était en cause et enfin connaître la variation dans la séquence des acides aminés constitutifs du peptide incriminé.

I - Mise en évidence de l'Anomalie Caténaire : l'HYBRIDATION.

C'est grâce à une technique originale dite "d'Hybridation" que ITANO - SINGER et Coll. (38-39) d'une part, GAMMACK - LEHMANN et Coll. (24) d'autre part, précisèrent sur quelle chaine siégeait l'anomalie structurale, pour la plupart des Hémoglobines découvertes à ce jour.

Nous allons décrire la technique utilisée par GAMMACK et Coll. en prenant pour exemple l'Hybridation de l'Hb I avec l'Hb D. On utilise des solutions de Carboxyhémoglobine.

L'Hb I est d'abord séparée de l'Hb A par électrophorèse sur bloc d'amidon. La fraction I est éluée avec une solution de Cl Na 0,02 M, puis concentrée par dialyse avec le même Cl Na. La concentration de cette dilution hémoglobinique est ensuite ajustée à 3 % 40 µl de cette solution sont mélangés à 40µl de la solution à 3 % d'Hb C et l'ensemble divisé en deux parties égales. La première moitié du mélange est additionnée d'un égal volume de tampon acétate de sodium de pH = 4,7 et de force ionique 0,2. A la deuxième partie on ajoute un volume égal de tampon phosphate de pH = 6,8 et de force ionique 0,2. Ces solutions représentent, respectivement, le mélange dissocié et recombiné et la solution témoin. Les deux solutions sont maintenues 4 heures à 4°C puis dialysées séparémment, pendant 20 heures, avec un litre de tampon phosphate de pH = 6,8 saturé en Oxyde de Carbone.

L'analyse est effectuée par électrophorèse en gel d'Amidon avec un système tampon discontinu ou un tampon phosphate de pH = 7,4.

Les zones hémoglobiniques sont colorées par réaction avec la Benzidine, le noir naphtalène est utilisé pour colorer les fractions protéïniques non Hb.

II - Mise en Evidence du Peptide Anormal: "FINGER - PRINTING".

Poussant encore plus loin les investiga-

tions, on a pu déterminer dans la chaine anormale, quel peptide était la cause de l'anomalie structurale et ceci grâce à la méthode dite du "Finger-Printing" due à INGRAM (34-35).

Le principe en est le suivant :

La solution hémoglobinique est soumise à une digestion par la trypsine qui coupe les chaines au niveau de la lysine et de l'arginine. Le mélange de peptides obtenus, qui se compose d'environ 28 fragments, est soumis à une simple chromatographie sur papier ou à une électrochromatographie. Chaque peptide prend une place bien déterminée en fonction de sa charge et les diverses tâches obtenues sont révélées par les réactifs habituels des acides aminés. La "carte" ainsi obtenue est comparée à celle fournie par l'hémoglobine A, soumise au même traitement.

Voici décrites, les techniques utilisées au Laboratoire du Docteur CABANNES :

1° - Préparation d'un Digestat Trypsique.

On prépare une solution d'hémoglobine purifiée par électrophorèse sur bloc d'Amidon. On sépare les chaines α et β par chromatographie à l'aide d'un gradient de solution d'urée suivant la technique de CHERNOFF (12) on tamponne 2ml de cette solution renfermant de 2 à 5 % d'Hb à pH = 8,0 avec du bicarbonate d'ammonium.

On met alors ce mélange au bain-marie pendant 4 mn.

On ajoute 0,2 ml de solution de trypsine

à 200 mg. % (avec un excès de $CO_3 (NH_4) 2$.

Remuer le tout avec un agitateur en verre. On bouche le tube et on laisse au bain-marie à 37° pendant une heure et demi à trois heures. Il est préférable de procéder sous azote et d'utiliser une agitation magnétique continue.

Centrifuger et mettre le surnageant au bain marie à 100° pour éliminer la trypsine. Recentrifuger. Le digestat trypsique est prêt. Il est préférable de concentrer par lyophylisation (qui élimine l'excès de bicarbonate de NH_4) ou de le dialyser pour réduire les volumes. Conserver au congélateur à -30° ou mieux sous forme lyophilisée, en attendant son utilisation.

Sur le mélange ainsi obtenu, on peut procéder à trois analyses principales :

- Soit une chromatographie sur papier,
- Soit une électrophorèse à haut voltage,
- Soit enfin une électrochromatographie.

Il faut environ 3 mg. de produit sec dilué dans 20 ml d'eau, pour faire une électrochromatographie.

2° - Chromatographie Ascendante

Solution Tampon (Butanol..... 300 ml.
(CH3 COOH pur..... 100 ml.
(Eau distillée..... 100 ml.

Mode Opératoire : On utilise une feuille de papier WHATMANN 3 MM. de 46 cm de long. On place le digestat à étudier à 8 cm du bord de départ.

Il faut 8 bandes par échantillon. On laisse le chromatogramme se développer pendant 20 heures. On caractérise ensuite les différentes bandes par les réactions des acides aminés.

3° - Electrophorèse à Haut Voltage

a - Solution Tampon :

Tampon pH = 4	(Pyridine.....	250 ml
	(CH_3 COOH.....	600 ml.
	(Eau q.s.p.....	1000 ml
Tampon pH=5, 2	(Pyridine.....	350 ml
	(CH_3 COOH.....	175 ml
	(Eau q.s.p.....	4000 ml
Tampon pH=6, 4	(Pyridine.....	400 ml
	(CH_3.COOH.....	16 ml
	(Eau q.s.p.....	4000 ml

Technique : On utilise un redresseur permettant d'obtenir des d.d.p. de 2 000 volts, et une cuve réfrigérée spécialement conçue au Laboratoire du Docteur CABANNES.

On utilise une feuille de papier WHATMANN 3 MM. de 43, 6 cm de long. Après l'avoir placée sur le chevalet, on dépose 100 mm^3 de digestat trypsique à 17 cm du départ. En utilisant le tampon pH = 6, 4 la migration s'effectue du pôle positif au pôle négatif. La durée maxima de passage du courant de 2 000 volts, varie suivant l'intensité notée, 5 minutes après le départ, au générateur. Plus l'intensité est élevée, plus le

temps de passage est raccourci. Celui-ci n'exède pas 90 mn et n'est jamais inférieur à 50 minutes.

Pour réduire au maximum, le grand échauffement, dû à l'effet Joule, l'ensemble tampon papier, est plongé dans une cuve remplie d'Ether de Pétrole qui fait office de vecteur de calories et parcourue par des tubes réfrigérants, à circulation d'eau froide.

4° - Electrochromatographie

Elle s'effectue toujours sur le digestat trypsique, mais en deux temps : Chromatographie descendante et électrophorèse à haut voltage.

On utilise une feuille de papier WHATMANN 3 MM. de 49 cm x 46,4 cm et dentée sur le côté le plus large. On dépose sur cette feuille et en un point situé respectivement à 9 cm du bord le plus large et à 20 cm de l'autre bord, 100 mm^3 de digestat trypsique, que l'on fait sécher au fur et à mesure à l'air chaud.

a - Chromatographie descendante ou ascendante.

On fait migrer pendant 20 heures en utilisant un tampon de composition suivante :

- Pyridine.....	35 ml
- Alcool Isoamylique.....	35 ml
- Eau distillée.....	30 ml

Le long d'une bande de 3 cm de large, on dépose quelques gouttes de digestat, qui serviront de témoin de chromatographie. Celle-ci s'effectue

parallèlement au côté mesurant 46,4 cm.

b - Electrophorèse

Au bout de 20 heures, on soumet la feuille précédente à l'électrophorèse à haut voltage, décrite plus haut. On a pris soin au préalable, de découper la bande de 3 cm portant le témoin de chromatographie ainsi que les dents. On travaille en tampon pyridine-acétique de pH = 6,4 et dans une direction perpendiculaire au sens de la chromatographie.

Après l'électrophorèse, on sèche à l'étuve et on révèle les spots par les réactions habituelles des acides aminés.

5° - Révélation

Les bandes et tâches seront déterminées par passage aux U.V. et ensuite colorées par la réaction à la Ninhydrine.

III - Mise en Evidence de l'Anomalie au niveau des Acides Aminés.

Après avoir établi l'anomalie structurale d'un ou de plusieurs peptides, on détermine sa composition en acides aminés. On peut alors par comparaison avec la formule du peptide correspondant de la chaine normale, voir sur quel amino acide porte la substitution.

Ce peptide, est repris, élué et traité par hydrolyse acide. On le scinde alors en ses acides

aminés constitutifs par chromatographie bidimensionnelle. Il ne reste plus qu'à identifier ceux-ci par leur réaction caractéristique, donnée à la fin de ce chapître.

Ainsi, dans le cas de l'Hb S, l'anormalité porte sur le peptide occupant la place n° 4 à l'électrochromatographie. Comme son homologue de l'Hb A, il s'est avéré être composé de 9 acides aminés, mais il en diffère par le septième, qui est pour l'Hb A de l'acide glutamique et pour l'Hb S de la valine.

De même dans l'Hb C, l'acide glutamique du peptide n° 4 est remplacé par la Lysine.

Dans le cas de l'Hb E, c'est encore un acide glutamique qui est remplacé par de la Lysine, mais cette mutation siège ici, sur le peptide n° 26.

Or, si l'acide glutamique possède, dans la chaine peptidique normale, une charge électrique négative, la valine est électriquement neutre et la lysine est chargée positivement. Ceci confère à l'ensemble de la molécule, une charge électrique différente qui explique les variations de mobilité électrophorétique.

PRINCIPALES REACTIONS DE CARACTERISATION DES ACIDES AMINES.

I - Ninhydrine : (Tous peptides) : 0,1 % dans l'Alcool à 95°. Sécher à l'étuve après pulvérisation sur la bande.

II - Ninhydrine - Collidine (Tous peptides)

Ninhydrine.....	0,3 g.
Alcool absolu.....	300 ml.
CH_3 COOH.....	100 ml
Collidine.....	40 g.

Conserver au réfrigérateur - Sécher la bande à l'étuve.

III - PAULY I (Tyrosine - Histidine)

R.I. : NO_2 Na à 5 % dans l'eau

R.2.	(Ac Sulfanilique.....	0,9 g.
	(Cl H. conc.....	9,0 ml
	(H_2 O q.s.p.....	100 ml

R.3. : CO_3 Na_2 à 5 % dans l'eau distillée.

Vaporiser le mélange 50 ml R.I. + 10 ml R.2. sur la feuille humide vaporiser R.3 Orangé - Sécher au frais.

IV - PAULY II (Histidine)

R.1.	(Ac. Sulfanique.....	0,8 g.
	(Cl H conc.....	8 ml
	(H_2O q.s.p.....	100 ml

R.2 : NO_2 Na à 0,69 % dans H_2O.

R.3 : CO_3Na_2 à 10 % dans H_2O.

Vaporiser le mélange 30 ml R.1 plus 30 ml R.2 - quand la feuille est presque sèche vaporiser R.3 - Sécher au frais.

V - α Nitroso β Naphtol (Tyrosine-Tryptophane) :

R.1. : 0,1 % α nitroso β naphtol dans l'acètone
R.2. : NO_3H à 10 % dans l'acétone,

- Tremper la bande dans R.1. et sécher
- Tremper la bande dans R.2. et sécher 3mn à 90°

Tyrosine → rose
Tryptophane → jaune sale.

VI - Sakaguchi (Arginine)

R. 1. : Diacétyl à 0,1 % dans H_2O
R. 2. : K O H à 20 % dans H_2O
R. 3. : α Naphtol 2,5 % dans alcool absolu.

Mélanger à volumes égaux et dans l'ordre R.1 + R.2. + R.3.

Tremper la bande en agitant légèrement- Sécher au frais.

VII - R. d'Ehrlich

-Paradiméthylaminobenzalhéhyde:0, 5g) ou encore:
-Alcool à 95°.....100ml) 1g. P.D.M.
-Cl H conc..... 2 ml) + 100 ml alcool.

Exposer la bande aux vapeurs Cl H.

Cymuréine → orange Tryptophane → violet
Citruline → jaune Noyau Indol → rouge.

VIII - Isatine

-Isatine.....100mg : chauffer
-Butanol contenant 5% : jusqu'à dis-
CH_3 - COOH..... 50ml : solution.
Sécher à 90°

Proline → bleu intense Phénylalanine → bleu vert
Hydroxyproline → bleu pâle Tyrosine → bleu vert

Autres A. A. → de rose à violet.

E - AUTRES TECHNIQUES

Toutes les techniques que nous avons précédemment décrites ont pour but de séparer et de caractériser les différentes fractions hémoglobiniques en mettant à profit les différences de propriétés biochimiques ou physico-chimiques.

Ces méthodes s'appliquent à toutes les hémoglobines. Cependant il existe des techniques complémentaires qui permettent de préciser la caractérisation de la fraction hémoglobinique isolée. Nous les avons groupées dans ce paragraphe où nous nous proposons de les décrire sommairement.

I - Etude Spectrale

a - Spectre d'absorption dans le visible

Une seule hémoglobine anormale ne possède pas la même courbe d'absorption que l'Hb A, c'est l'Hb M. Le spectre pris entre 3500 et 6500 A. est caractérisé par les points suivants :

Hb A : min à 6000 Å. max. à 6300 Å. max. à 5000Å. max. à 4060 Å.
Hb M: min à 5700 Å. max. à 6000 Å. max. à 5000 Å. max. à 4060 Å.

b - Spectre dans l'U.V.

Ce spectre est caractéristique de l'Hb grâce à la bande de Tryptophane. Celle-ci est à 2910 A. pour l'Hb A et la majorité des autres Hémo-

globines. C'est seulement pour l'Hb F qu'il y a un déplacement de cette bande, qui se situe à 2898 A.

II - Techniques Immunologiques

Dès 1940, DARROW et Coll. (15) ont démontré la spécificité antigénique des Hb A et F, par une réaction de précipitation entre l'anti-sérum d'Hémoglobine de nouveau né et l'Hb A. Ce résultat a été précisé par CHERNOFF en 1953 (12), toujours par des réactions de précipitation. Utilisant la réaction d'Hémoglobinisation SCHNEIDER & LEWIN (61) ont pu ainsi caractériser l'Hb S. LEHMANN et MOURANT (46) de leur côté utilisent un procédé dérivé de la méthode de déviation du complément. Ces auteurs ont ainsi non seulement réussi à différencier l'Hb A de l'Hb F, mais aussi l'Hb C de l'Hb S et également l'hémoglobine de l'anémie de COOLEY de l'Hémoglobine F. Ce dernier résultat est très important car, avant eux, on considérait l'hémoglobine thalassémique comme identique à l'Hb F.

Seuls, DERRIEN & REYNAUD (19) par leur méthode, d'électrophorèse en veine liquide, en tampon cacodylique à pH = 6,5 de faible force ionique d'une part, et CHINI et Coll. (13) en étudiant la cinétique de la dénaturation en milieu acide d'autre part, avaient soupçonné une différence de structure entre ces deux hémoglobines alcalino-résistantes.

D'autres auteurs utilisant une technique d'immunoélectro-chromatographie en gélose, ont obtenu des résultats également intéressants.

Voici sommairement décrites ces méthodes :

1° - Réaction de fixation du Complément

- Détermination d'une parenté antigénique entre les différentes hémoglobines, sur la base d'une combinaison de chacune d'elles, avec les anticorps homologue des autres.

Cette mesure s'effectue par l'intermédiaire d'un réactif hémolytique, entre un sérum de cobaye anti-mouton et les cellules rouges homologues. Le sérum hémolytique est obtenu par un e ponction cardiaque sur un cobaye. Les cellules rouges de mouton recueillies fraiches, sont mises en suspension à 4 %. Les solutions hémoglobiniques sont préparées selon la méthode générale. Les anticorps sont obtenus par injections répétées de la solution hémoglobinique à un lapin. Le sang de celui-ci, recueilli au bout de huit jours est inactivé. On procède à la réaction exactement comme dans les réactions classiques de la syphilis (technique KOLMER).

2° - Immuno électrochromatographie en Gélose

Cette technique fut utilisée en France par DEPIEDS et Coll. (16) et aux U.S.A. par HELLER et Coll. (28).

Les immunsérums sont obtenus comme dans la technique précédente, par injection de solution d'Hb à des lapins. DEPIEDS et Coll.

n'ont pu obtenir d'anticorps réagissant contre l'Hb A., mais ils ont réussi à préparer un anticorps spécifique de l'Hb F et un anticorps mixte, réagissant à la fois sur l'Hb A et l'Hb F.

Les auteurs Américains, de leur côté, ont retrouvé le pouvoir antigénique de l'Hb F et également celui de la fraction A_2.

Voici la technique généralement utilisée:

La gélose est coulée sur la plaque comme précédemment décrit dans le paragraphe consacré à l'électrophorèse. On prend soin de ménager des "gouttières" de part et d'autre de l'échantillon, afin d'y déposer l'immum-sérum à la fin de l'électrophorèse. Suivant les auteurs, on utilise un tampon à pH 8,2 ou un tampon discontinu à pH 8,8 et une différence de potentiel de 300 volts, pendant 90 minutes environ. A l'issue de l'électrophorèse, l'immum-sérum est déposé dans les gouttières et l'ensemble abandonné une nuit, en chambre humide. La lecture est ensuite effectuée.

III - Tests Hématologiques

En plus des méthodes physico-chimiques que nous venons de décrire, on utilise les caractères hématologiques permettant d'orienter les recherches. Il faut noter cependant, qu'en eux-mêmes, les tests sont insuffisants pour permettre d'affirmer que l'on se trouve en présence d'une hémoglobine, plutôt que d'une autre.

Ils nécessitent tous une analyse physico-chimique complémentaire.

Voici, tout de même, les principales déterminations hématologiques pouvant être utilisées:

1°- Recherche de "Cellules Cibles"

Dans le cas d'une hémoglobinose C, les globules rouges prennent parfois une forme particulière dite en forme de cible. La recherche de ces formes anormales sur un frottis de sang, peut donc être utile.

2° - Test de falciformation

Dans les hémoglobinoses S on observe souvent que les globules rouges, prennent une forme très particulière en faucille ou en croissant. On les recherche de la manière suivante :

- Une petite goutte de sang est placée au centre d'une lame. On y ajoute deux gouttes d'une solution à 2 % de Métabisulfite de sodium, fraichement préparée. On mélange avec un coin de lamelle.

La préparation est laissée jusqu'à 48 heures au repos et est alors examinée entre lame et lamelle au microscope, réglé pour une intensité lumineuse faible. On observe les cellules en croissant très facilement. PAULING & ITANO ont essayé d'expliquer cette falciformation en la rapportant à une diminution de la solubilité de l'Hb en milieu insuffisamment oxygéné. Dans ce cas, la diminution de solubilité de l'Hb S, entrainerait la précipitation d'Hb S réduite. Ces molécules s'orienteraient dans le

milieu intra-cellulaire, saturé, et la deshydratation de l'hématie qui accompagne le phénomène, provoquerait l'apparition de la forme en croissant. En milieu oxygéné l'HbS réduite, s'oxyde et se solubilise à nouveau.

3° - Recherche des Cristaux & des Inclusions Intra-Erythrocytaires.

Les travaux de AGER & LEHMANN (1) ont permis de démontrer la formation de cristaux dans des érythrocytes contenant des hémoglobines anormales. Ceci est obtenu en mettant en contact pendant 6 heures en chambre humide à 20°C une goutte de sang, avec une solution isotonique de Métabisulfite de Sodium, de Citrate de Sodium ou de Chlorure de Sodium.

Ces auteurs ont observé la formation de ces cristaux dans des érythrocytes contenant des mélanges hémoglobiniques A + C, A + D, A + E, A + F, A + K, A + L. Seuls les mélanges A + S n'ont pu donner ces formations cristallines.

Dans le cas de l'Hémoglobine H, on observe des inclusions rondes réfringentes, apparemment non cristallines, appelées Corps de RIGAS. L'observation de ces corps inclus, est facilitée par l'adjonction à la préparation précédente, d'une goutte de solution à 1 % de bleu de crésyl brillant.

Si la présence "in vitro" de cristaux dans les érythrocytes ne peut donc pas être spécifique d'un pigment hémoglobinique par contre les corps RIGAS, sont eux caractéristiques de l'Hb H.

IV - Autres Techniques

Pour en terminer avec cette revue des techniques de caractérisation des pigments hémoglobiniques, citons un certain nombre de procédés qui aident à compléter l'identification de certaines fractions.

1° - Dénaturation par le Froid

Si l'on soumet une solution d'Hémoglobine H à une température inférieure à 0°C, ce pigment est complètement dénaturé et ne peut plus être identifié par les techniques habituelles. C'est la seule Hémoglobine à présenter ce caractère.

2° - Vitesse d'étalement en films monomoléculaires.

Ici encore on a observé des différences, dans le comportement des différentes hémoglobines, qui sont dues à une variation de viscosité de ces pigments.

3° - Etude de la Synthèse de l'hème des Hémoglobines par les Eléments Radioactifs.

Ces travaux ont été effectués en France par SCHAPIRA - DREYFUS - KRUH - PAOLETTI et BOIRON (59-60).

Ces auteurs ont d'abord démontré l'existence de deux hémoglobines chez l'homme. Ils injectent du Fe^{59} à un homme, prélèvent son sang

4 jours après, et la solution hémoglobinique obtenue est chromatographiée. On obtient ainsi un certain nombre de fractions. On mesure l'activité spécifique des diverses fractions. Les différences observées permettent d'arriver à la conclusion précitée.

Pour étudier le métabolisme de ces fractions, les prélèvements de sang ont été faits à des temps variables. Ceci leur a permis d'enregistrer une différence dans la vitesse de formation de ces deux hémoglobines.

Ces auteurs ont ensuite étendu leurs recherches au sang du cordon, non seulement par l'adjonction de fer radioactif mais également par du Glycocolle marqué au C^{14} sur le méthylène. Ils ont alors constaté que l'activité spécifique du fer et du carbone de l'hème, et du glycocolle isolé de la globine, est plus élevée pour la fraction de type adulte, que pour celle de type fœtal.

Renouvelant leurs expériences, cette fois-ci chez les lapins, et avec de la phénylalanine et de la tyrosine marquées, ils ont conclu à une hétérogénéité dans le métabolisme des diverses fractions hémoglobiniques.

Nous voici au terme de cet exposé des différentes techniques.

L'étude des "Mutations Invisibles" est du domaine du Laboratoire de Recherche, et il n'est pas dans nos intentions de faire la critique des méthodes qui y sont utilisées.

Par contre, les très nombreuses techni-

ques proposées pour le dépistage et la caractérisation des pigments anormaux peuvent dérouter les Laboratoires qui sont appelés à les utiliser.

C'est pourquoi nous allons, dans le prochain chapître donner notre expérience d'un certain nombre de techniques.

Techniques		Hb recemment découvertes
Electrophorese gélose pH 6,2	L S G O A F D I J P R 1 4 5 + → −	Alexandra 1 Bart's 2 Liberian 2 3 Hopkins 1 4 Hopkins 2 5 Norfolk 6 Lepore 7 Stanleyville 1 8 Fessas 10 2 9
Electrophorèse papier pH 6,5	C L S G E Q P A J K 8 3 N I M R 10 H − +	
Electrophorèse papier pH 8,6	C E A^2 O S L G Q A K R J N H 1 D P M 5 6 2 j 8 8 F 10 4 9 3 − → +	
Chromatographie . Carboxy methyl Cellulose →	C L S O F A 6 H E A^2 I K	
Chromatographie . Amberlite pH 6,00 →	C L S É O P A N I F H 2 Q D A^2 G J K 7	

CHAPITRE III

CHOIX D'UNE METHODE POUR L'INVESTIGATION HEMOTYPOLOGIQUE

P L A N

I - Buts réels d'une étude biochimique des Hémoglobines.

A - But Clinique
B - Biochimie pure

II - Techniques qui, à notre avis, présentent les meilleures qualités.

A - Pour l'examen Clinique
B - Pour la recherche biochimique pure.

Le chapître précédent nous a permis de faire le tour des techniques les plus utilisées. Bien que nous ayons restreint leur énumération nous pouvons en constater l'abondance.

Il parait logique de distinguer parmi elles, deux groupes de méthodes :

- Celles qui sont des procédés de dépistage ou de caractérisation des "Mutations Visibles". Elles peuvent servir de technique préparatoire aux suivantes.

- Celles qui mettent en jeu des manipulations plus complexes, plus fines, qui apportent des données précises sur la constitution moléculaire de la globine.

Il est évident que la pratique seule permet un choix sélectif pour la conduite de l'investigation dans un sens déterminé. Pour cela, nous avons utilisé, dans l'esprit de leurs inventeurs les différentes techniques déjà rapportées. Nous avons comparé leurs résultats. Nous avons été conduits à en modifier certaines pour les besoins de notre propre expérimentation.

L'intérêt de l'étude biochimique des hémoglobines humaines est à notre avis double :

I - Pour le clinicien et l'hémotypologiste elle permet d'identifier le type d'Hb, de définir l'anomalie hémoglobinique caractère d'un population ou cause réelle d'une maladie. C'est une recherche clinique qui devient de plus en plus habi-

tuelle. Elle peut être utilisée sur une grande échelle au cours d'enquêtes anthropologiques d'autant mieux qu'elle dispose de procédés techniques simples, qui peuvent être mis entre toutes les mains.

2° - Pour le Biochimiste ou le Généticien, la connaissance de la structure de la molécule d'Hb est encore du domaine de la recherche.

Les méthodes utilisées sont longues, complexes, précises. Elles mettent en jeu un matériel couteux. Elles nécessitent un personnel technique spécialisé, bien entrainé. De plus, elles ne peuvent être exploitées d'une manière extensive. Leur exposé sort donc du but que nous poursuivons ici, de codifier des méthodes simples et commodes destinées surtout au dépistage des anomalies et à leur identification.

CHOIX DES TECHNIQUES

A - Pour l'Examen Clinique

1° - Préparation d'une Solution Pure d'Hémoglobine.

Cette solution doit être très pure. Il faut surtout éliminer toute trace de protéïnes sériques ou de protéïnes stromatiques, susceptibles d'interférer dans la suite de l'analyse.

Nous avons adopté la technique suivante : Le sang est prélevé sur tube sec, donc sans anticoagulant. Le hématies prélevées sur héparine, oxalate, de Wintrobe ou A.C.D. conviennent également. Pour les transports lointains il convient d'ajouter au sang prélevé un peu de Merthiolate ou un antibiotique. Tous ces adjuvants sont éliminés par lavages soigneux avec du sérum physiologique avant de procéder à l'hémolyse.

Pour hémolyser, ajouter au culot d'hématies lavées, son volume d'eau distillée. Agiter et placer au congélateur pendant quelques heures. Le séjour dans celui-ci assure une hémolyse très complète et l'adjonction d'Alumine avant centrifugation permet de précipiter tous les stromas globulaires. Il ne reste plus qu'à titrer cette solution et à

l'ajuster à la concentration désirée.

Cette solution d'Hb O_2 se conserve très bien au congélateur sans se transformer rapidement en méthémoglobine. Par la suite, il est possible, si le besoin s'en fait sentir, de la convertir en Hb CO par simple saturation avec de l'Oxyde de Carbone pur, ou même en Cyanméthémoglobine très stable.

Cette technique a cependant un inconvénient dans le cas, assez rare il est vrai, où l'on se trouve en présence d'Hb H. Celle ci est dénaturée par le froid et n'apparait plus par la suite. Dans ce cas précis, on se contente de laisser hémolyser le sang à + 4°C au réfrigérateur, pendant 24 heures.

2° - Dosage de l'Hémoglobine

Un très grand nombre de méthodes sont à notre disposition. Pour notre part, nous avons écarté les procédés à l'Hématine alcaline ou acide, et la technique par réduction, car elles comportent une marge d'erreur relativement importante. Les méthodes utilisant le dosage du fer sont précises mais longues et pour celà difficilement adaptables à des dosages en grande série. Notre choix s'est finalement porté sur les techniques utilisant la transformation en cyanméthémoglobine et plus particulièrement sur le dosage préconisé par DRABKIN

Cette méthode rapide, peut se pratiquer indifféremment sur des échantillons d'Oxyhémoglobine et aussi de Methémoglobine. Signalonsen passant, que si le sang à analyser est déjà vieux,

et donc riche en Méthémoglobine, il n'est pas nécessaire de faire cristalliser l'Hb pour la purifier. Il suffit de transformer la totalité du pigment en Cyanméthémoglobine qui se comporte en électrophorèse et en chromatographie exactement comme l'Oxyhémoglobine.

3° - Test de la R.D.A.

Ici encore, quatre variantes sont à notre disposition. La méthode de JONXIS & VISSER est précise mais assez longue et nécessité pour chaque échantillon l'établissement de courbes de dénaturation. Celles ci peuvent apporter des renseignements intéressants pour un travail de recherche, mais superflus dans un diagnostic systèmatique.

La technique de DERRIEN & LAURENT est plus intéressante mais plus longue que celle de SINGER, tout en n'apportant pas de précisions supplémentaires. Son seul avantage est de permettre de travailler sur des solutions moins concentrées en Hb. Cependant la détermination de la R.D.A. selon le processus de SINGER nous semble préférable, car très simple et très rapide.

Il est des cas pourtant, où cette méthode se révèle insuffisante. Lorsque le taux d'Hb R.D.A. se trouve à la limite de la normalité, c'est-à-dire aux environs de 2 %, il vaut mieux recommencer le dosage en utilisant le procédé décrit par BETKE. Celui-ci qui est d'ailleurs une simple modification des techniques de SINGER, est spécialement conçu pour le dosage de petites quantités d'hémoglobine R.D.A.

	SINGER	DERRIEN	BETKE
Ahmed D..... 6 ans	3,4 %	3,7 %	-
Zerouh B..... 8 ans	6,8 %	6,4 %	8,7 %
Fatima S..... 3 ans	0,9 %	1,1 %	1,7 %
Georges V..... 7 ans	1,2 %	0,9 %	1,9 %
Bachia R..... 12 ans	74,3 %	76,2 %	-
Mohamed S..... 4 ans	84,7 %	82,4 %	-
Bahia F..... 8 ans	11,4 %	13,0 %	12,8 %
Roger S..... 2 ans	0,9 %	1,3 %	0,87 %
Sang de cordon 1	69,0 %	71,3 %	72,7 %
Sang de cordon 2	82,3 %	85,0 %	86,4 %
Sang de cordon 3	78,2 %	77,4 %	78,1 %

TABLEAU COMPARATIF DE DOSAGES de R. D. A.

Les méthodes comme celles de DERRIEN ou de BETKE qui font intervenir une plus grande dilution paraissent plus précises, mais leurs résultats sont comparables à ceux de la technique de SINGER.

Quand ces dosages donnent des résultats nettement élevés nous pouvons légitimement supposer que nous sommes en présence d'une Thalassémie qu'il nous faudra cependant confirmer par électrophorèse et chromatographie. Par contre, un résultat négatif ne nous permet d'écarter aucune hypothèse. Rappelons en effet qu'il existe des thalassémies se traduisant par une augmentation de la fraction A_2 le pourcentage d'Hb R.D.A. étant normal.

Dans tous les cas, l'électrophorèse s'impose donc comme moyen d'investigation.

4° - Electrophorèse

a - Electrophorèse sur papier.

L'utilisation du papier filtre comme support a permis à l'électrophorèse de devenir une technique courante de laboratoire. Les manipulations deviennent plus faciles, l'appareillage plus réduit et moins couteux qu'en veine liquide. L'adoption d'un support poreux a en outre l'avantage de supprimer les courants de convection et les effets de parois. Enfin il est possible d'analyser plusieurs échantillons à la fois.

La vitesse avec laquelle migre une particule protéïque est la résultante de plusieurs mouvements : Un courant d'évaporation dû à l'effet Joule, un courant électroosmotique et bien entendu la force électrophorétique. La molécule d'Hb étant un ampholyte , sa mobilité sera aussi influencée par le pH et la force ionique de la solution tampon. Par conséquent le sens de migration sera différent selon que l'on utilise un tampon de pH supérieur ou inférieur au point isolélectrique de la molécule. Celle ci acquiert alors une charge négative (et se dirige vers l'anode) ou une charge positive (et migre vers la catode).

La charge des particules protéïques peut aussi être modifiée par le nombre et la valence des ions qu'elles absorbent en surface d'où l'influence de la nature du tampon.

Ce bref rappel de phénomènes présidant à la migration électrophorétique sur support nous montre toute l'importance du choix du papier, de la nature et du pH du tampon, enfin de l'appareillage et des conditions expérimentales.

Il convient de discuter certains "tours de mains".

- Electrophorèse horizontale plutôt que verticale : la première nous a donné de meilleurs résultats tout en étant d'une utilisation plus commode.

- Disposition du papier : nous prenonsdu papier épais type WHATMANN 3 MM. bien tendu

par des masselottes. La feuille est découpée en pistes séparées pour chaque échantillon d'Hb ce qui supprime une grande partie des phénomènes d'en dosmose et de rhéophorèse. En particulier il n'y a plus "d'Effets de bords".

Le dépôt du spot (5 à 10 µl) se fait à la règle en une ligne peu épaisse avec une pipette capillaire.

En ce qui concerne le tampon, nous avons coutume d'utiliser :

- Un tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,025 qui permet une très bonne résolution des variétés d'hémoglobines.

- Un tampon phosphate de pH 6,5 et de force ionique 0,07. Ce dernier permet de séparer quelques hémoglobines dont la mobilité à pH alcalin est identique. (Hb H et I en particulier).

Pour la routine, nous effectuons toujours une première électrophorèse de dépistage, à pH 8,6. Nous étudions 18 échantillons sur une même feuille (1cm par sang). Les cas intéressants sont ensuite repris sur des bandes plus larges avec des témoins connus à pH 8,6 et à pH 6,5.

- Le temps d'électrophorèse et le courant: 300 à 400 volts stabilisés en intensité ; la durée, variable de 3 à 6 heures, est déterminée essentiellement par la longueur de la migration (6 à 7 cm pour Hb A).

- Coloration et lavage : la bande humide

est colorée au bleu de bromophénol en solution alcoolique saturée de sublimé qui fixe et colore en même temps. Laver ensuite par de l'eau acétique jusqu'à une bonne révélation des spots.

Cette méthode se prête souvent aux évaluations qualitatives. Certes il est nécessaire de caractériser très exactement l'hémoglobine mais dans certains cas on peut avoir à effectuer soit une détermination quantitative, soit une séparation des fractions en présence. Les autres techniques électrophorétiques et la chromatographie vont nous y aider.

b - Electrophorèse sur Gel d'amidon.

La mobilité d'une particule en électrophorèse sur papier est la résultante d'une chromatographie d'adsorption sur la cellulose et d'une électrophorèse.

La migration au sein d'un gel est sous la dépendance d'un facteur supplémentaire en rapport avec la très grande finesse de texture de ce support. Le cheminement à l'intérieur de ce gel sera donc étroitement lié au poids spécifique des molécules et à leur forme. En fait, un effet de filtration vient s'ajouter aux conditions de l'électrophorèse.

Ce procédé donne des résultats plus fins et plus sélectifs que ceux obtenus sur papier. On l'a vu à propos de la décomposition électrophorétique du sérum sanguin qui montre beaucoup plus de

fractions qu'en électrophorèse sur papier. Mais la préparation d'un Gel d'amidon exige un tour de main, l'observation rigoureuse des différents temps de la manipulation afin de toujours se placer dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour le mode d'inclusion d'échantillon à analyser nous avons préféré la technique du papier imprégné de solution d'Hb malgré un risque de diffusibilité dans le milieu. Cette façon de procéder est beaucoup plus commode et donne de meilleurs résultats que la confection d'une pâte avec de l'amidon.

Le choix du tampon se fait en fonction des résultats attendus :

- L'utilisation d'un tampon véronal à pli 8,6 est la plus courante. Si cela n'apporte pas de renseignements supplémentaires les séparations sont plus nettes et plus lisibles. D'autre part les fractions lentes apparaissent mieux.

- L'emploi d'un système tampon discontinu, suivant la méthode de POULIK, augmente le gradient de pH. La méthode devient beaucoup plus fine à condition toutefois que l'électrophorèse soit verticale.

D'excellents résultats ont ainsi été obtenus :

- Pour les fractions plus lentes que Hb A en tampon Tris-borate.
- Pour les fractions plus rapides que Hg A en tampon Tris-EDTA.

Une différence de potentiel de 200 volts au papier pendant 12 heures, permet d'excellentes séparations.

L'électrophorèse terminée, on découpe le gel en deux parties. L'une est colorée à l'amidoschwartz, l'autre à la Benzidine.

Certains ont essayé de faire une étude quantitative par passage des bandes au densitomètre. Il semble que la méthode manque de reproductibilité (le coefficient d'extinction variant d'un gel à l'autre). On peut y remédier en augmentant la transparence du gel, en le faisant macérer dans la glycérine.

c - Electrophorèse sur bloc d'amidon

Cette méthode, d'un maniement assez simple lorsque on s'en tient à la méthode de KUNKEL, est intéréssante dans quelques cas particuliers :

- Dans la séparation et la purification des fractions anormales, qui peuvent être reprises et dosées après élution à PH 7,0

- Pour l'identification d'un certain nombre de fractions telle l'Hb A_2, dont elle permet également le dosage précis.

d - Electrophorèse sur Gélose

Ce support est assez facile à obtenir et donne des résultats intéressants. Cependant, étant donné sa très grande résistivité, le temps d'électropho-

rèse nécessaire pour obtenir une bonne séparation est assez long. Les résultats les plus significatifs sont obtenus à pH 6, 5

La gélose est dissoute à chaud dans un tampon phosphate de pH 6, 5 et coulée sur une plaque de verre préalablement soupoudrée de gélose en poudre. Après solidification on retire la plaque et on creuse avec un petit emporte pièce de petits trous dans lesquels on dépose la solution d'hémoglobine. On recouvre celle-ci par de la gélose liquide. On pose sur cette plaque une feuille de plastique qui évite toute évaporation. La préparation est posée à cheval sur les cuves contenant la solution tampon et reliée à ces dernières par des ponts de papier filtre épais. Nous faisons passer un courant de 350 volts pendant 14 à 16 heures. Après avoir retiré la feuille en plastique, on colore au bleu de bromo-phénol dans l'alcool acétique.

On sépare ainsi l'hémoglobine F de l'Hb A et aussi l'Hb D de l'Hb S.

e - Electrophorèse sur acétate de cellulose

Comme test complémentaire, pour séparer et caractériser les fractions hémoglobiniques lentes, cette méthode donne d'excellents résultats. Elle est d'un maniement aussi simple que l'électrophorèse sur papier tout en ayant l'avantage d'une plus grande finesse. De plus elle est rapide (une heure sous 300 volts) et se prête assez bien à une détermination quantitative. Elle est notamment très utile pour l'évaluation d'une quantité anormale

de la fraction A_2.

Nous utilisons la technique décrite dans le chapître précédent. Il est important de manipuler les bandes avec beaucoup de précaution afin d'éviter toute pliure qui entrainerait des modifications de migration. Au moment de l'humidification de la bande il faut la déposer sur la solution tampon et la laisser s'imbiber seule. Le séchage partiel se fait ensuite entre deux feuilles de papier filtre sans presser. La solution hémoglobinique est appliquée à la règle avec une pipette capillaire. On fait passer un courant de 300 volts pendant une heure et la migration s'effectue du pôle négatif au pôle positif. Les bandes humides sont ensuite colorées en les posant sur la solution adéquate., la face ayant reçu le dépôt d'Hb dirigée vers le bas.

f - Electrophorèse sur gel acrylamique

Nous manquons personnellement d'expérience en ce qui concerne cette technique, n'ayant pu nous procurer du "Cyanogum". D'après les auteurs qui l'ont utilisée, elle parait cependant intéressante, car elle est rapide et permet de bonnes séparations des fractions lentes comme Hb A_2 par exemple.

5° - Chromatographie

a - sur Amberlite IRC 50

Cette résine donne d'excellentes sé-

parations de pigments hémoglobiniques et la simplicité du matériel utilisé (petites cuvettes rectangulaires en matière plastique transparente) a permis d'en faire une méthode de routine à condition cependant de respecter certains impératifs techniques.

Deux points ont retenu notre attention :

- Tout d'abord l'activation de l'amberlite. Des deux procédés à notre disposition celui décrit par HUISMANN nous paraît le meilleur. Il faut se conformer strictement à la technique décrite par cet auteur et citée au chapitre précédent. En particulier, l'ébullition doit être maintenue en permanence pendant le contact avec la soude. Les lavages à l'eau distillée doivent être effectués très soigneusement afin d'éliminer toute trace de soude d'abord et de ClH ensuite. La conservation de cette résine activée se fait sous eau distillée et à la température ordinaire. Le tampon citrate doit être ajusté exactement à pH 6,0 à l'aide d'un pH-mètre. La résine coulée dans la cuve ne doit pas être trop tassée. Nous la recouvrons d'une mince bande de papier filtre.

- La température et le débit du tampon doivent être respectés avec soin. Il est nécessaire de se conformer aux indications de HUISMANN et PRINS et de régler le passage du tampon à une vitesse maximum de 15 à 20 ml par heure. L'ensemble doit être maintenu aux environs + 4°C (±1°) en plaçant l'appareil en chambre froide.

Pour la plupart des pigments on retrouve les mêmes mobilités qu'en électrophorèse sur

papier. Cependant certains d'entre eux migrent différemment, ce qui permet de les caractériser. C'est le cas des Hb E, L, F, H. l'Hb F par exemple, qui migre à peine moins vite que l'Hb A en électrophorèse à pH 8,6 se déplace beaucoup plus vite en chromatographie à pH 6,0 et s'en sépare nettement.

Pour conserver les résultats on peut prendre un cliché photographique de la cuve où plus simplement recopier sur un calque aux dimensions exactes de l'appareil les différents spots obtenus à leurs niveaux respectifs.

b - chromatographie sur Carboxyméthylcellulose

La technique décrite précedemment appelle peu de commentaires. La préparation de cette résine est assez longue. Toutefois, elle donne d'excellents résultats. En tampon pH 6,0 on obtient des migrations légèrement différentes de celles observées sur Amberlite. Ce procédé permet, par élution, une détermination quantitative en particulier pour Hb A_2.

c - chromatographie sur DEAE - Cellulose

L'utilisation de cette technique est essentiellement quantitative. En effet, les fractions séparées par cette méthode peuvent être facilement éluées par le tampon même qui a servi à leur séparation. La concentration en hémoglobine de l'éluat

est ensuite évaluée au spectrophotomètre. C'est une façon d'obtenir des pigments purs.

On l'utilise surtout dans l'étude de la fraction A_2 mais aussi des hémoglobines S, E, C.

Dans un certain nombre de cas l'application d'une technique complémentaire permet une caractérisation définitive d'un pigment anormal.

Ainsi, il est difficile de différencier l'Hb D de l'Hb S. Excepté en milieu gélosé ces deux fractions ont des mobilités électrophorétique et chromatographique voisines.

L'étude de leur solubilité en solutions salines concentrées les départage aisément. En effet, l'Hb S sous forme réduite reste insoluble alors que l'Hb D réduite montre une solubilité identique à l'Hb A. Nous avons effectué cette différenciation en utilisant la technique d'ITANO.

B - Etude Biochimique proprement dite

Le travail pour le chercheur commence au point exact où il s'est arrêté pour le clinicien.

Nous avons pensé qu'il était nécessaire de donner un aperçu des grandes méthodes qui ont permis une meilleure connaissance de la structure des hémoglobines. Cependant ces procédés sont hautement spécialisés et du domaine de quelques laboratoires bien équipés et bien entrainés. Ils sortent

du domaine pratique dans lequel nous désirons nous cantonner. C'est pour cela que nous nous contenterons de les évoquer et de les analyser succintement.

La fraction hémoglobinique caractérisée par les procédés de routine est d'abord séparée et purifiée. Ceci est obtenu soit par électrophorèse sur bloc d'amidon suivie d'une élution à pH 7,0 soit par chromatographie sur DEAE-cellulose.

A ce moment seulement commence l'application des méthodes précises auxquelles il faudra apporter la plus grande attention :

- La mise en évidence de l'anomalie caténaire par le procédé d'HYBRIDATION décrit par GAMMACK et Coll. semble donner d'excellents résultats. Dans cette technique, après dissociation et recombinaison des chaînes, on utilise pour l'identification des hybrides l'électrophorèse en gel d'amidon.

- La détection du peptide anormal s'opére par la méthode du " FINGER - PRINTING" due à INGRAM. Ce procédé, très élégant permet d'excellentes séparations des peptides qui sont analysés après élution.

- La détection de l'acide aminé anormal fait appel à des techniques classiques en biochimie à savoir l'hydrolyse acide du peptide suivie d'une chromatographie bidimensionnelle sur papier. Les A.A. sont alors révélés par leurs réactifs habituels.

En résumé, pour l'étude clinique et hémotypologique des hémoglobinoses, le plan que nous proposons est le suivant :

1 - Dépistage.
- Test de la R.DA
- Electrophorèse sur papier à pH 8,6
- Test de falciformation (si l'on a du sang frais).

2 - Caractérisation
- Electrophorèse sur papier, en bandes larges à pH 8,6 et pH 6,5
- Chromatographie sur amberlite IRC 50 en tampon citrate à pH 6,0

3 - Détermination qualitative complémentaire
- Electrophorèse sur gel d'amidon
  - en tampon tris-borate
  - en tampon tris-EDTA
- Electrophorèse en Gélose, en tampon 6,5
- Test de solubilité d'ITANO
- Test de dénaturation par le froid (sang frais)
- Recherche des corps de RIGAS (sang frais)

4 - Détermination quantitative
- Electrophorèse sur acétate de cellulose
- Chromatographie sur DEAE-Cellulose
- Chromatographie sur Carboxyméthylcellulose

Pour la caractérisation les tests à utiliser dépendent des résultats obtenus au moment du dépistage. Ils sont choisis en fonction de l'identification à faire. Ainsi on ne fera pas d'électrophorèse en gélose si l'on sait avoir une Hb rapide. De même la caractérisation d'Hb S ou d'Hb C pourra aisément se faire dès le dépistage à pH 8,6 si le test de falciformation a été positif.

Les méthodes poussées d'électrophorèse ou de chromatographie interviennent lorsque l'on n'est pas sûr de l'emplacement exact d'une fraction hémoglobinique, ou bien lorsque le spot isolé est difficilement identifiable même par rapport à des témoins.

Il convient de dire que la commission internationale des hémoglobinopathies a fixé un certain nombre de standards d'identification auxquels on doit se référer pour reconnaître l'hémoglobine humaine.

Il est bien entendu que l'identification sommaire, dans un but clinique, d'une hémoglobine nouvelle devra comporter une étude biochimique complète et en particulier la détermination précise de l'anomalie moléculaire.

C'est dans cet esprit que nous avons voulu réaliser ce travail. Notre but n'étant pas d'apporter toutes les techniques utilisables en biochimie des hémoglobines mais d'exposer un certain nombre d'entre elles employées surtout pour l'hémotypologie.

Les exemples d'enquêtes que nous rapportons

au chapître suivant fixent le cadre de notre étude.

CHAPITRE IV

APPLICATION DE CES TECHNIQUES A DES ENQUETES ANTHROPOLOGIQUES

Jusqu'à ce jour les études anthropologiques étaient basées essentiellement sur des critères physiques ou sociologiques. L'hémotypologie, plus récente, apporte un élément nouveau à l'étude des races. En particulier elle définit avec précision le patrimoine fondamental de l'individu et permet d'analyser chaque groupe ethnique grâce à l'existence et à la répartition de types définis.

L'Hémoglobine est conditionnée par un gène dont la manifestation est facilement identifiable par les techniques que nous venons de décrire. Elle permet de suivre un grand nombre d'individus marqués de façon indélébile.

Au cours de nos travaux, nous avons eu l'occasion de participer à des enquêtes séro-anthropologiques consacrées à un certain nombre de populations en des endroits différents du monde. Les résultats que nous rapportons, à titre d'exemple, pour bien montrer la valeur et l'utilité de méthodes que nous avons sélectionnées, concernent plus particulièrement un groupe de populations hétérogènes concentrées sur l'Ile de Macao, des groupes ethniques du Tibesti et du Sud du Maroc (région de Tindouf), des individus appartenant à diverses tribus du Sénégal et du Sud de la Mauritanie.

MACAO

Races	Nbre d'échantillons analysés	Résultats			
		AE	AA_2	AS	Fréquences Hb E
CHINOIS	645	24	4	2	0,02
NOIRS	22	-	-	-	-
MONGOLOIDES	56	2	-	-	-
METIS	159	1	11	1	-
BLANCS	78	-	1	-	-
TOTAL	962	27	16	3	0,014

TIBESTI

Tribus	Echantillons analysés	AS	SS	AC	Fréquences Hb S
TEDA	80	8	-	-	0,047
TEDA/JAZA	26	2	-	-	0,035
JAZA	22	5	1	-	0,125
KAMADJA	18	5	-	-	0,109
TOTAL	146	20	1	0	0,071

T I N D O U F

Tribus	E	AS	SS	AC	Fréquences
Hautes-Régulbat	383	-	-	1	-
Hautes-Tadjaran	69	-	-	-	-
Arabo-Berbère	27	-	-	-	-
Marocain	13	-	-	-	-

SENEGAL

	Nbre d'échs	AS	SS	AC	CC	SC	AG	AK	Fréquences HbS	Hb C	Hb K
Maures	44	6	-	1	-	-	-	2	0,067	0,011	0, 022
Toucouleur	292	35	-	4	-	1	1	7	0, 064	0,016	0, 008
Peul-Foula	114	24	-	3	-	-	1	3	0,090	0,007	0, 007
Ouoloff	121	19	-	1	-	-	-	5	0,068	0,004	0, 020
Serere	176	24	-	1	-	-	-	2	0,068	0,003	0, 006
Sa raroue	26	1	-	-	-	-	-	2	0,018	-	0, 036

Du point de vue technique, la réalisation de ces enquêtes a pu être effectuée grâce à l'organisation éprouvée du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Toulouse (Centre d'Hémotypologie du C.N.R.S.).

La collecte des échantillons, leur conditionnement pour le transport, leur acheminement rapide et leur étude, ont été réalisés dans des délais extrêmement brefs et dans des conditions particulièrement satisfaisantes puisque les déchets constatés n'atteignent pas 2 % des échantillons totaux.

Nous avons exposé dans les chapitres précédents les lignes essentielles de l'organisation technique.

Du point de vue des résultats, nous pouvons apporter les commentaires suivants :

1°- En ce qui concerne MACAO nous avons retrouvé une grande quantité d'Hb E parmi la population Chinoise. Cette constatation confirme les données déjà acquises sur la répartition du gène Hb E dans cette partie du monde.

Nous y avons trouvé quelques cas d'Hb AS, deux chez des Chinois, Un chez des métis. Ce fait ne doit pas nous surprendre car nous savons que l'Hb S est très ubiquitaire, mais que son introduction dans la population Chinoise de MACAO peut être imputée en grande partie aux brassages de populations réalisés par les Portugais dans cette Colonie, en particulier introduction d'éléments nègres pouvant provenir des colonies Portugaises d'Afrique (Angola et

Mosambique) où la densité du gène Hb S est très importante.

2° - L'enquête au TIBESTI, nous a montré d'une part la fréquence exceptionnelle du gène Hb S, d'autre part l'absence du gène Hb C. Cette constatation a apporté des précisions intéressantes du point de vue anthropologique sur l'origine supposée de ces populations mais surtout sur le mode de vie et les relations intertribales de cette partie du Sahara. La comparaison avec les groupes sanguins, réalisée par J. RUFFIE et J. DUCOS, confirme les données obtenues par l'étude de l'hémoglobine.

3° - A l'opposé, l'absence presque totale d'hémoglobinoses parmi les populations Berbères de la région de TINDOUF, nous permet de confirmer les notions déjà acquises à propos des populations berbères. Celles-ci ne présentent pas d'hémoglobinoses lorsqu'elles ont conservé des caractères ethniques relativement purs.

4° - L'enquête au SENEGAL nous a permis d'apporter une contribution complémentaire à la carte des hémoglobinopathies, résultat important déjà ent repris par plusieurs auteurs. Elle nous a montré la diversité des types hémoglobiniques rencontrés dans la population noire (AS, SS, AC, SC, AG, AK). Elle nous a permis de calculer les fréquences des gènes Hb S, Hb C et Hb K et de les replacer parmi celles qui ont déjà été établies. L'Hb S et l'Hb C présentent des fréquences attendues, compte tenu des études antérieures. Par contre, l'Hb K se montre beaucoup plus abondante qu'on ne le supposait. Ceci est une preuve nouvelle du carac-

tère ubiquitaire de l'Hb K dont la valeur biologique n'a pas encore été précisée. On sait en effet que cette hémoglobine, découverte chez les Kabyles négrifiés à forte densité d'hémoglobinoses diverses, a été un certain temps interprétée comme un caractère spécifique du berbère. Si l'on a pu préciser et confirmer qu'elle était héréditaire, elle reste cependant une des rares hémoglobines dont l'anomalie biochimique, localisée à la chaine α n'a pas encore été déterminée avec précision.

CONCLUSIONS

La recherche des types hémoglobiniques prend de plus en plus d'importance sur le plan clinique et dans le domaine particulier de l'anthropologie.

Les tests biochimiques qui permettent la différenciation des hémoglobines humaines sont nombreux et variés.

Dans ce travail nous avons essayé de dégager certains de ces tests pour offrir une série de moyens simples, commodes, efficaces et précis, utilisables dans les laboratoires de cliniques ou de séro-anthropologie. Il nous a paru nécessaire de dégager des critères biochimiques de différenciation de ces pigments.

Après une première partie consacrée au rappel des connaissances actuelles sur les hémoglobines, nous avons décrit la plupart de ces techniques. Nous avons été amené à distinguer deux grandes catégories de méthodes :

- Les techniques de dépistage et de caractérisation : RDA, électrophorèse de zone sur papier, amidon, gélose ou acétate de cellulose,

chromatographie d'adsoprtion sur amberlite ou d'élution sur DEAE - cellulose, sans oublier les tests complémentaires de falciformation ou de recherche des corps de RIGAS.

- Les procédés permettant la connaissance de la structure moléculaire de la globine : technique d'Hybridation pour la recherche de l'anomalie caténaire, FINGER-PRINTING avec électrochromatographie pour la mise en évidence du peptide défectueux.

Notre but étant essentiellement pratique nous avons surtout étudié les méthodes de routine. Au cours de nos travaux nous avons utilisé la plupart des procédés décrits et nous avons pu comparer les résultats obtenus avec chacun d'eux. L'étude critique de ces méthodes à la lumière de notre expérience et la proposition d'un plan de travail simple font l'objet de la troisième partie de cette thèse.

Pour terminer nous avons voulu donner des exemples d'utilisation de ces techniques. Les résultats que nous avons obtenus au cours des enquêtes séro-anthropologiques auxquelles nous avons participé sont très intéressants.

- Nous avons ainsi retrouvé à MACAO une grande quantité d'Hb E Parmi la population Chinoise. Cette constatation confirme les données déjà acquises sur la répartition du gène Hb E dans cette partie du monde.

- La fréquence exceptionnelle du gène Hb S au TIBESTI apporte des précisions intéressantes

sur l'origine supposée des populations de cette région ainsi que des relations intertribales.

- Par une étude des populations de la région de TINDOUF nous avons pu confirmer les travaux déjà publiés et démontrant l'absence totale d'hémoglobinoses parmi les populations berbères.

- En ce qui concerne notre enquête au SENEGAL les résultats obtenus nous ont permis de compléter la carte des hémoglobinopathies de cette région. La diversité des types hémoglobiniques rencontrés dans la population noire (AS, SS, AC, SC, AG, AK) appelle un certain nombre de commentaires. L'Hb S et l'Hb C s'y retrouvent à des fréquences attendues. L'Hb K par contre se montre beaucoup plus abondante qu'on ne le supposait.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AGER J.A.M. and LEHMANN H. J. Clin. Path. (1957) 10 336

2 - ALBERTY R.A. J. Chem. Education (1948) 25, 426-33, 619-25

3 - ALLEN - SCHROEDER et BALOG Journ. Amer. Chem. Sor. (1958) 80, 16-28

4 - ALTSCHUL A.M. - A.E. SIDWELL et T.R. HOGNESS J. Biol. Chem. (1939) 127, 123.

5 - ANDERSCH M.A. - Fec. Proc. (1953) 12, 168.

6 - BOARDMAN N.K. et PARTRIDGE S.M. - Nature (1953) 171, 208.

7 - BOARDMAN N.K. et PARTRIDGE S.M. - Biochem. J. (1955) 59, 543.

8 - BOMAN H.G. - Nature (1955) 175, 898.

9 - CABANNES R. et DERRIEN Y. - Exposé Annuel de Bioch. Méd. (1958) 9, 101 - 121

10 - CABANNES R. - MONNET A. - et BEURRIER Critères Bioch. de la différenciation des Hb Humaines C.R.T.S. Toulouse

11 - CABANNES R. et PORTIER - Ab

12 - CHERNOFF A.I. - Blood (1953) 8, 319 et 413

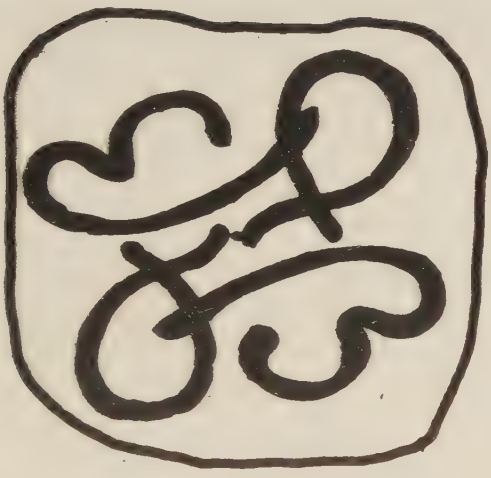
13 - CHINI V. - PEROSA L. PUTIGNANO et BINI- Giorn. Bioch. Napoli (1954) 156-162

14 - CROSBY - MONN and FURTH - U.S. Armed. Forces Med. j ; (1954) 5,693 - 703
15 - DARROW R.R. - NOWAKOWSKY- S. et AUSTEIN - Arch. Pathol. (1940) 30,873
16 - DEPIEDS R. - BATTAGLINI P. - LAURENT G. C.R. Soc. Biol. (1959) t - 153, p - 795
17 - DEPIEDS R. - BOFFA G. - et ORSINI A. - C.R. Soc. Biol. (1958) t - 152 p - 1549
18 - DERRIEN Y. et LAURENT G. - C.R. - Soc. Biol. (1954) 148,717
19 - DERRIEN Y. et REYNAUD J. - C.R. - Soc. Biol. (1955) 149, 1595, 1602
20 - DIACONO H. et CASTAY M. Ann. Rech. Méd. (1957) Juillet n° 6
21 - DIACONO H. et CASTAY M. Pat. Biol. (1959) vol. 7 - n° 19 - 20 2.085
22 - FERRIS T.G. - EASTERLING et BUDD - Blood (1962) Vol. 19 - n° 4 pp 479 - 482
23 - GAMMACK D.B. - HUENS - SHOOTER et GERALD - J. Méd. Biol. (1960) 2 - 372
24 - GAMMACK D. B. - HUENS et LEHMANN - Acta Génética et Statistica Médica (1961) 11
25 - GERALD P.S. and DIAMOND - Blood (1957) 12, 61
26 - GOLDBERG C.A. - Clin. Chém. (1957) 3, 1-19
27 - GOMORI G. "Méthodes in Euzymology" Ed. Colowick et Kaplan Vol. I p. 144-acad. Press. Inc. New-York 1955
28 - HELLER P. - YAKULIS V.J. et JOSEPHSON The Journal of Lab. and Clin. Méd. Saint Louis 1962 - 59, 3, 401
29 - HEILMEYER L. et Von MUTIUS - Dtsch. Arch. Klin. Méd. (1958) 182, 164 - 75
30 - HUISMANN T.H.S. - Haémoglobin-Colloquium Wien (31-8-1961) pp 95-96

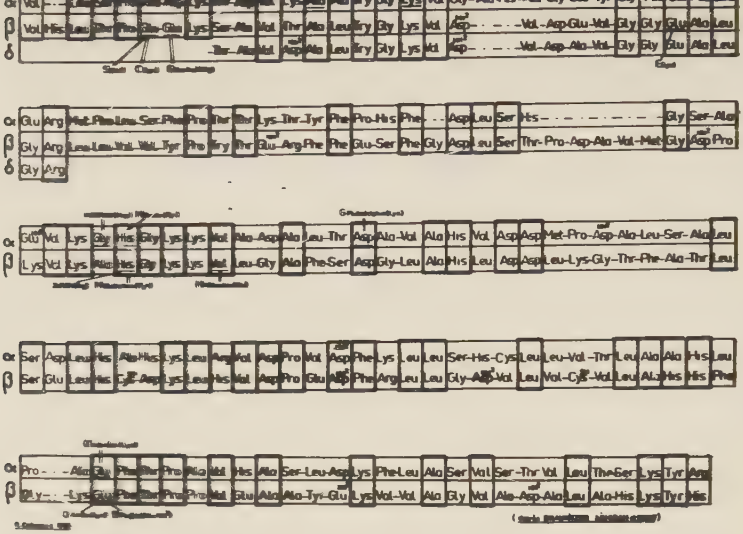
31 - HUISMANN T.H.S. et DOSY A.M. - J. Chromatography (1961)
32 - HUISMANN T.H.S. et PRINS H.K. - J. Lab. Clin. Méd. (1955) 46, 255
33 - HUNT J.A. - LEHMANN H. - Hémoglobin Bart's : A fœtal Haémoglobin Without alpha chain 1959 - Nature 184, 872
34 - INGRAM V.M. - Aspecific Cheminal betiveen the globins of normal human and sickle all anemi Hoemoglobins (1956) Nature 178, 792
35 - INGRAM V.M. - Sc Amer (1958) 198, 68
36 - INGRAM V.M. - 1961 - Gene evolution and the haemoglobins Nature 189, 704
37 - ITANO H.A. - Arch. Biochem (1953) 47-148 59
38 - ITANO H.A. et ROBINSON E. - Annal. New-York Académy of Sciences (1960) Vol. 88 - Art. 3 pp 642
39 - ITANO H. A. et SINGER S.V. - National Académy of Sciences (1958) Vol 44 n° 6 pp 522 - 529
40 - JONXIS et HUISMANN - A laboratory Manual on Abnormal Haemoglobins (1959) Masson Ed.
41 - JONXIS et VISSER - Amer. J Dis. Child. (1956) 92, 588, 91
42 - KLOBUSITSKY (D. von) et KONIG P. - Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.(1939)192-271
43 - KOHN J. - Biochm. J. (1957) 65 p 9
44 - KRUH J. DREYFUS J.C. et SCHAPIRA G. Bull. Soc. Chim. Biol. (1952) 34, 73
45 - KUNKEL H.G. - CEPELLINI R. - MULLER EBERHARD H. - WOLF J. (1957) J. Clin. Invest. 36, 11

46 - LEHMANN H. - IKIN E.W. - et MOURANT - A.E. - Brit. M.J. (1953) 2,602
47 - LONGSWORTH L.G. - In . "Méthod In Médical Research" (1952) Vol. 5 pp 63 - 106
48 - MORETTI J. - BOUSSIER G. - et JAYLE M.F. Bul. Soc. de Chim. Biol. (1957) 593
49 - MORRISON et COOK J. L. - Science (1955) 122,920
50 - NEEL J.V. - 1949 - The inheritance of sickle cellanémia Science 110, 64
51 - PAULING et Coll. - sickle cellanémia a molecular disease Science 110, 543
52 - PETERSON E.A. et SOBER H.A. - J. Amer. Chem. Soc. (1956) 78,751
53 - PRINZ H.K. et HUISMANN T.H.J. - J. Lab. et Clin. Med. 1955, 46,255
54 - RAYMOND S. - NAKÁMICHI et AURELL - Nature (1962) Vol. 195 n° 4.842 p. 697
55 - ROCHE et DERRIEN - Rev. Hémat. (1951) 6, 470 - 84
56 - ROCHE, DERRIEN et col. - Bul. Soc. Chim. Biol. (1954) 36, 51-63
57 - ROBINSON A.R. ROBSON M. et ZUELZER V.W. - J. Lab. Clin. Med. (1957) t. 50 P.745
58 - SANSONE G. et CUSMANO F. - Boll. Soc. Ital. Biol. Spec. (1950) 26, 1343, 1680
59 - SCHAPIRA G. DREYFUS J.C. et KRUH J. Giornate Biochimiche Italo-Franco-elvetiche (1954) Napoli 21, 24 aprile
60 - SCHAPIRA J.C. DREYFUS J.C. et KRUH J. PAOLETTI C. et BOIRON M. C.R. Soc. Biol. (1955) E. 149 p.1178

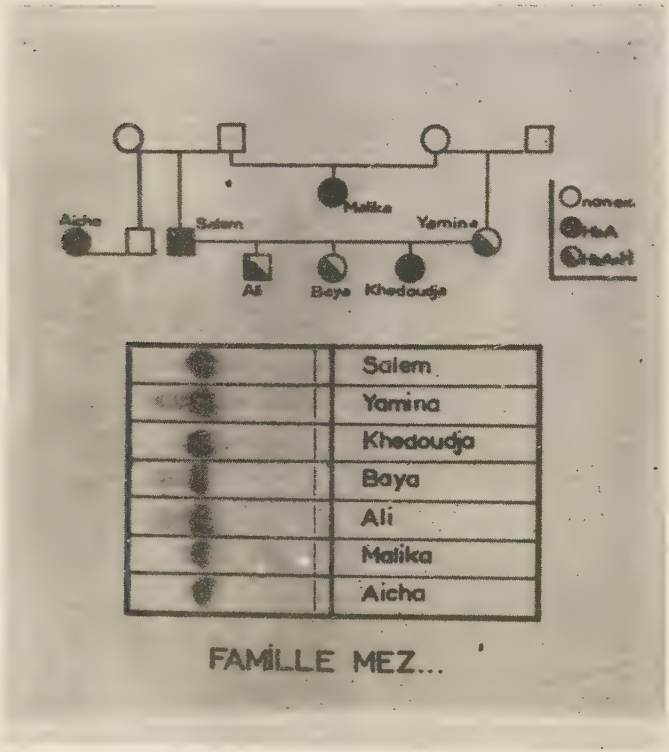
61 - SCHNEIDER R.G. et LEVIN W.W. - Pro. Soc. Exp. Biol. Med. (1950) 75-110
62 - SCHROEDER W.A. - 1959 - PORTSCHR - Chem. Org. Naturet 17,322
63 - SEIP M. - Acta Med. Scand. Suppl. 282 (1953)
64 - SINGER K. CHERNOFF et SINGER L. - Blood (1951) 6, 413-29
65 - SINGER K. CHERNOFF et SINGER L. - Ibrd. (1951) 6, 429-35
66 - SMITHIES O. - Biochem. J. (1955) 61, 629-641
67 - DE VRIES - Haematologisch Ouderzock Wetens-chappelijKe Uitgeverij N.V. Amsterdam (1955
68 - WATSON - WILLIANS et WERTHERALL - The Laboratory characterization of Human Hb
69 - WONG - J. Biol. Chim. (1925) 55, 421.



SCHEMA D'UNE MOLECULE D'HEMOGLOBINE
(d'après PERUTZ)
Les 4 chaines de l'hémoglobine sont disposées symétriquement par rapport à un axe.



Principales séquences d'Amino Acides avec les variations pour quelques Hb anormales.



Schema d'une enquête génétique.

DEUXIEME THESE

METHODES DE DOSAGE

DE

L'OXYDE DE CARBONE

TABLE DES MATIERES

	Pages
PLAN GENERAL.....	9
INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE I - Les Différentes Hémoglobines humaines et leurs critères de Différenciation	15
CHAPITRE II - Revue Générale des Techniques.....	47
CHAPITRE III - Choix d'une Méthode pour l'investigation Hémotypologique.....	116
CHAPITRE IV - Exemples d'application.	138
CONCLUSIONS.....	147